

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Distribución y efectos del piretroide ciflutrin sobre el sistema
nervioso central**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Luis Rodríguez Gutiérrez

Directores

María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS DEL
PIRETROIDE CIFLUTRIN SOBRE EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

Bajo la dirección de las Profesoras Doctoras

**María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS DEL
PIRETROIDE CIFLUTRIN SOBRE EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

Bajo la dirección de las Profesoras Doctoras

**María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS DEL
PIRETROIDE CIFLUTRIN SOBRE EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Farmacología y Toxicología**

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

Madrid, 2018

Deseo expresar mi agradecimiento,

A mis Directoras de Tesis Doctoral, las Profesoras Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología y Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Contratado Doctor de Toxicología, del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por todas sus enseñanzas, confianza, y apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Profesor Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, y Director del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2013-2014 cuando de forma generosa me aceptó a iniciar mis estudios de Doctorado en Veterinaria y a formar parte del Grupo de Investigación UCM-GR17-920204 “Toxicología y Seguridad de Agente Químicos y Biológicos” que dirige. Su ayuda, estímulo y enseñanzas han sido decisivos para la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos los miembros y compañeros del Grupo de Investigación UCM-GR17-920204 del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida, que me han animado siempre para la realización y consecución de este trabajo, y en especial a la Profesora Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Catedrática de Toxicología, por todo su tiempo y paciencia dedicada a mi formación en investigación.

A mi madre, a mi padre y hermanos por todo su apoyo y afecto, y por animarme enormemente durante todos estos años de mi vida fuera de mi país.

A Maggie, mi esposa, por apoyarme en todo momento, por su paciencia y su constante ayuda en estos años en Madrid.

A mis amigos y colegas Bernardo, Wilfredo, Siever, María, Boris, Manuel, Juan, y Francisco por acompañarme a la distancia.

Deseo expresar mi agradecimiento al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC), Beca Presidente de la República 2013-III, del Ministerio de Educación del Gobierno de Perú por la ayuda recibida para realizar mis estudios de Doctorado en la Universidad Complutense de Madrid, España.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Departamento de Farmacología y Toxicología

**Facultad de Veterinaria
28040 Madrid**

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Contratado Doctor de Toxicología del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN que **D. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ**

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada **“Distribución y Efectos del Piretroide Ciflutrin sobre el Sistema Nervioso Central”** en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a

28 de mayo de dos mil dieciocho.

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero

Prof. Dra. Irma Ares Lombán

Trabajo financiado por:

- Proyecto Ref. nº S2013/ABI-2728 (ALIBIRD-CM) “Alimentos funcionales y estrategias nutricionales eficaces para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas”. Programa de Actividades de I + D entre Grupos de Investigación de la Comunidad de Madrid en Tecnologías
- Proyecto/Acción Coordinado nº RTA2015-00010-C03-03. Evaluación del potencial (antibacteriano y antifúngico) de extractos e hidrolizados proteicos procedentes de la biota marina para su aplicación en el sector agroalimentario. Subproyecto nº 3: “Evaluación de la toxicidad in vitro e in vivo de compuestos activos caracterizados de extractos e hidrolizados proteicos procedentes de la biota marina”. Programa Estatal de I+D+I orientada a los Retos de la Sociedad. Reto de Seguridad y Calidad Alimentaria, Actividad Agraria Productiva y Sostenible, Sostenibilidad de los Recursos Naturales e Investigación Marina y Marítima. Convocatoria 2015. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PIRETRINAS	8
3.2. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LAS PIRETRINAS: PIRETROIDES	10
3.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN.....	14
3.2.2. SIGNOS DE INTOXICACIÓN Y CLASIFICACIÓN.....	28
3.2.3. TOXICOCINÉTICA	31
3.2.4. TOXICIDAD EN MAMÍFEROS.....	40
3.2.5. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS	51
3.3. CIFLUTRIN.....	56
3.3.1. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN	58
3.3.2. TOXICIDAD DE CIFLUTRIN	60
3.4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	66
4. MATERIAL Y MÉTODOS	68
4.1. ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y ORAL	68
4.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.....	68
4.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL	69
4.1.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE CIFLUTRIN EN PLASMA Y EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	70
4.1.4. ANÁLISIS DE DATOS	75
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	80
4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	80

4.2.2. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE SEROTONINA Y METABOLITO ÁCIDO 5-HIDROXI-3-INDOLACÉTICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	81
4.2.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE DOPAMINA Y METABOLITOS ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIFENILACÉTICO Y ÁCIDO HOMOVANÍLICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	83
4.2.4. ANÁLISIS DE DATOS	87
4.3. REACTIVOS	87
5. RESULTADOS	89
5.1. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN EN PLASMA TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y ORAL	89
5.2. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL	98
5.3. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	109
5.3.1. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA Y METABOLITO ÁCIDO 5-HIDROXI-3-INDOLACÉTICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	109
5.3.2. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y METABOLITOS ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIFENILACÉTICO Y ÁCIDO HOMOVANÍLICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	119
6. DISCUSIÓN	128
7. CONCLUSIONES	144
8. BIBLIOGRAFÍA	147
9. ANEXO	190

Los resultados de la presente investigación han dado lugar a dos publicaciones:

J.L. RODRÍGUEZ, I. ARES, V. CASTELLANO, M. MARTÍNEZ, M.R. MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, A. ANADÓN and M.A. MARTÍNEZ (2016). Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. **Environmental Research**, 146, 388-394. (ISSN: 0013-9351) Impact Factor: 3.088 Rank in Category: Environmental Sciences, 15/216, D1

J.L. RODRIGUEZ, I. ARES, M. MARTINEZ, M.R. MARTINEZ-LARRAÑAGA, A. ANADÓN, and M.A. MARTINEZ (2018). Bioavailability and nervous tissue distribution of pyrethroid insecticide cyfluthrin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 118, 220-226. (ISSN: 0278-6915) Impact Factor: 3.778, Rank in Category: Food Science and Technology, 8/129, D1

RESUMEN

1. RESUMEN

Los piretroides son insecticidas sintéticos que presentan una amplia variedad de usos. Ciflutrin es un insecticida piretroide de Tipo II de amplio espectro utilizado en agricultura, en medicina veterinaria, en medicina humana y a nivel residencial en forma de aerosol. El sistema nervioso es el principal sitio de acción de los piretroides, debido a su efecto sobre los canales de sodio voltaje-dependientes, así como sobre los canales de calcio y su interacción con el receptor ionóforo de GABA. Aunque inicialmente se atribuía a los piretroides una baja toxicidad en mamíferos, diversos estudios han demostrado su efecto neurotóxico en roedores y otros animales, produciendo en ratas el síndrome CS, que se caracteriza por salivación, ataxia, hiperexcitación, convulsiones y parálisis. Existe información limitada sobre la distribución de ciflutrin y sus efectos sobre los niveles de monoaminas en el sistema nervioso central (SNC). El presente trabajo de investigación incluye dos objetivos: (i) El estudio toxicocinético de ciflutrin en ratas Wistar macho tras administración de dosis única intravenosa (IV) (3 mg/kg p.c.) y oral (20 mg/kg p.c.), y (ii) evaluar el efecto de ciflutrin, tras administración oral (1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c., 6 días), sobre los niveles de monoaminas en regiones cerebrales de ratas Wistar macho.

(i) Para determinar la toxicocinética de ciflutrin, se obtuvieron muestras de sangre tras la administración IV y oral. Las muestras de tejido cerebral también se recogieron tras la administración oral. Las concentraciones de ciflutrin en plasma y tejidos cerebrales (hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal) se cuantificaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS). Las curvas de los niveles plasmáticos de ciflutrin frente al tiempo se ajustaron adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental usando el programa Phoenix versión 8.0 (Pharsight Corporation). La administración de ciflutrin vía oral mostró en

plasma una amplia absorción y una eliminación lenta. El área bajo la curva concentración frente al tiempo [$AUC_{(0-24h)}$] y la concentración máxima plasmática (C_{max}) fueron $6,11 \pm 1,06$ mg h/L y $0,385 \pm 0,051$ µg/mL, respectivamente y la semivida de eliminación en la fase β ($t_{1/2\beta}$) fue $17,15 \pm 1,67$ h. La biodisponibilidad oral (F) fue $71,60 \pm 12,36\%$. Tras la administración oral, ciflutrin se distribuyó ampliamente a los tejidos cerebrales. El $AUC_{(0-24 h)}$ fue significativamente mayor en todos los tejidos cerebrales analizados que en el plasma. La mayor diferencia se encontró en el hipotálamo donde el $AUC_{(0-24 h)}$, C_{max} y $t_{1/2\beta}$ fueron $19,36 \pm 2,56$ mg h/L, $1,21 \pm 0,11$ µg/g y $22,73 \pm 1,60$ h, respectivamente. La cinética tisular también mostró una eliminación lenta del piretroide de los tejidos del sistema nervioso central.

(ii) Las ratas tratadas con ciflutrin (1, 5 y 10 mg/kg p.c., vía oral, 6 días), no presentaron lesiones ni signos clínicos evidentes de toxicidad. Sin embargo, las ratas tratadas con ciflutrin a la dosis más alta (20 mg/kg p.c., vía oral, 6 días) mostraron contracción muscular con leve incoordinación del movimiento en las extremidades posteriores, sin discinesia ni temblor al cabo de 1-2 horas del tratamiento. Estos signos fueron reversibles a las 6 h después del tratamiento. Tras la última dosis de ciflutrin, se determinaron los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA), y dopamina (DA) y sus metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) en las regiones del cerebro hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo, cuerpo estriado y corteza frontal mediante HPLC con detección electroquímica. El ciflutrin (1 mg/kg p.c., vía oral, 6 días) no afectó a los niveles de 5-HT, DA y sus metabolitos en las regiones cerebrales estudiadas. El ciflutrin (5, 10 y 20 mg/kg p.c., vía oral, 6 días) originó un descenso estadísticamente significativo de los niveles 5-HT y su metabolito 5-HIAA, y de los niveles de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA de forma región cerebral- y dosis-

dependiente. Además, ciflutrin (20 mg/kg p.c., vía oral, 6 días) provocó un aumento estadísticamente significativo en la tasa de recambio de 5-HT en cuerpo estriado y mesencéfalo, así como también un incremento en la tasa de recambio de DA en cuerpo estriado y corteza frontal.

Asumiendo los parámetros toxicocinéticos identificados, este trabajo de investigación sirve para comprender mejor la toxicidad del piretroide Tipo II ciflutrin en mamíferos y para diseñar futuros estudios de neurotoxicidad. Los hallazgos observados en regiones cerebrales de ratas tratadas indican que la neurotransmisión serotoninérgica y dopaminérgica se ve afectada por la exposición al ciflutrin y puede contribuir al espectro general de neurotoxicidad causada por este piretroide.

ABSTRACT

2. ABSTRACT

Pyrethroids are synthetic insecticides used in a wide variety of applications. Cyfluthrin is a broad spectrum Type II pyrethroid insecticide, largely used in agriculture, in human and veterinary medicine and added even in household spray formulations. The nervous system is the main target, mainly due to its effect on voltage sodium channels, as well as on calcium channels and to its interaction with the GABA receptor-ionophore complex. Although initially considered to have a low toxicity in mammals, studies have been conducted to evaluate pyrethroids neurotoxicity in rodents and other animals, causing in rats the CS-syndrome, characterized by salivation, ataxia, hyperexcitation, convulsions, and paralysis. There is limited information about the toxicokinetics of cyfluthrin and its effects on the monoamines levels in the central nervous system (CNS). The present investigation includes two objectives: i) to study in male Wistar rats the toxicokinetics of cyfluthrin after single intravenous (IV) (3 mg/kg bw) and oral (20 mg/kg bw) doses, and ii) to examine in male Wistar rats the effects of cyfluthrin after oral exposure (1, 5, 10 and 20 mg/kg bw, 6 days) on brain region monoamine levels.

(i) To determine the cyfluthrin toxicokinetics, serial blood samples were obtained after IV and oral administration. Brain tissue samples were also collected after oral administration. Cyfluthrin concentrations in plasma and brain tissues (hypothalamus, striatum, hippocampus and frontal cortex) were quantified using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS). Cyfluthrin disposition was best described by the use of a two-compartment open model using the software Phoenix version 8.0 (Pharsight Corporation). When given orally, plasma kinetics showed an extensive oral absorption of cyfluthrin and a slow elimination. The area under the concentration-time curve [$AUC_{(0-24h)}$] and maximal plasma concentration (C_{max}) were

6.11 ± 1.06 mg h/L and 0.385 ± 0.051 μ g/mL, respectively and the β phase elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) was 17.15 ± 1.67 h). Oral bioavailability (F) was found to be 71.60 ± 12.36 %. After oral administration, cyfluthrin was widely distributed to brain tissues. $AUC_{(0-24h)}$ was significant higher in all tested brain tissues than in plasma. The largest discrepancy was found for hypothalamus. $AUC_{(0-24h)}$, C_{max} and $t_{1/2\beta}$ in hypothalamus were 19.36 ± 2.56 mg h/L, 1.21 ± 0.11 μ g/g and 22.73 ± 1.60 h, respectively. Tissue kinetics also showed a slow elimination of cyfluthrin from central nervous system tissues.

(ii) Cyfluthrin-treated rats (1, 5 and 10 mg/kg bw, orally 6 days), had no visible injury, i.e., no clinical signs of dysfunction were observed. However, rats treated with cyfluthrin at the highest dose (20 mg/kg bw, orally 6 days) showed skeletal muscle contraction in the hind limbs, slight movement incoordination without any signs of dyskinesia and tremor after 1-2 h of treatment. These signs were reversible at 6 h after dose. After last dose of cyfluthrin, serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxy-3-indolacetic acid (5-HIAA), and dopamine (DA) and its metabolites 3,4-hydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) levels were determined in brain regions hypothalamus, midbrain, hippocampus, striatum and frontal cortex by HPLC, electrochemical detection. Cyfluthrin (1 mg/kg bw, orally 6 days) did not affect the DA, 5-HT and metabolites levels in the brain regions studied. Cyfluthrin (5, 10 and 20 mg/kg bw, orally 6 days) caused a statistically significant decrease in 5-HT and its metabolite 5-HIAA levels, and DA and its metabolites DOPAC and HVA levels in a brain region- and dose-related manner. Moreover, cyfluthrin (20 mg/kg bw, orally 6 days) evoked a statistically significant increase in 5-HT turnover in striatum and midbrain, and in DA turnover in striatum and frontal cortex.

Assuming the identified toxicokinetics parameters, this study serves to better understand mammalian toxicity of Type II pyrethroid cyfluthrin and to design further studies to characterize its neurotoxicity. The findings observed in brain regions from treated rats indicate that serotonergic and dopaminergic neurotransmission are affected by exposure to cyfluthrin and may contribute to the overall spectrum of neurotoxicity caused by this pyrethroid.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

Los piretroides son compuestos análogos sintéticos de las piretrinas, sustancias naturales con actividad insecticida obtenida de las flores del género *Chrysanthemum*. Tanto las piretrinas como los piretroides están considerados como los insecticidas más utilizados como fitosanitarios, zoonosanitarios y como plaguicidas de uso doméstico, en la actualidad están clasificados como agentes neurotóxicos (NARAHASHI, 1985; VIJVERBERG y DE WEILLE, 1985).

Los piretroides, compuestos sintéticos, presentan mayor actividad biológica y mejores propiedades físico-químicas en comparación con sus análogos naturales, las piretrinas. Forman junto con los organoclorados (DDT, dieldrín, lindano, etc.), los organofosforados (paration, malation, etc.) y los ésteres metilcarbámicos (aldicarb, carbofuran, etc.), los cuatro grandes grupos de insecticidas orgánicos, siendo los piretroides los insecticidas de más amplio uso con un amplio espectro de acción frente a insectos que causan grandes pérdidas económicas (ELLIOT y JANES, 1978).

El término *pyrethrum* se refiere al extracto de las flores desecadas y pulverizadas pertenecientes a las especies *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Chrysanthemum roseum*. Estas flores tienen el aspecto de una margarita blanca común y en los últimos años se han seleccionado por técnicas de hibridación y cultivos celulares obteniendo flores que tienen un mayor rendimiento en la obtención de piretrinas (TAPLIN y MEINKING, 1990). Mediante la extracción con solvente de dicho polvo se obtiene el “extracto de *pyrethrum*”, cuyos constituyentes activos que se denominan genéricamente piretrinas presentan una potente actividad insecticida.

Se desconoce el momento y el lugar del descubrimiento de la actividad insecticida del *pyrethrum*, aunque LHOSTE (1964) afirma que ya se utilizaba en China en el siglo I a.c. El *pyrethrum* se introdujo en el siglo XIX en Europa, procedente de

Asia, de donde era originario la especie *C. cinerariaefolium*. Algunos autores afirman que en Europa la producción comercial de esta especie comenzó en Yugoslavia en 1840 (McLAUGHLIN, 1973). Ya en 1860 se exportaba a Estados Unidos y en 1919 el consumo en este país alcanzaba en coste los tres millones de dólares. Todavía hoy en día se continúa comercializando el extracto de *pyrethrum*, utilizándose las piretrinas en la actualidad como insecticidas de uso doméstico por poseer una toxicidad en mamíferos relativamente baja aunque la mayor desventaja frente a los piretroides sintéticos es que no presentan fotoestabilidad.

3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PIRETRINAS

El descubrimiento de la estructura química de las piretrinas fue un largo proceso que duró, aproximadamente, sesenta años. FUJITANI en 1909 las describió como ésteres, pero hasta la década de los sesenta no se conoció con exactitud la estructura química de sus compuestos.

En 1929, la FDA (Food and Drug Administration) desarrolló un método de ensayo para obtener las piretrinas, y por primera vez permitió medir la potencia del extracto del *pyrethrum* (GNADINGER y CORL, 1929).

SHEPARD (1939) inició la caracterización del extracto del *pyrethrum*, que consistía en una mezcla de ésteres de alcoholes y ácidos complejos. Posteriormente se identificaron seis piretrinas naturales, como los principales componentes del *pyrethrum*, denominadas piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I, y jasmolina II (CASIDA, 1980), siendo todas ellas ésteres de dos ácidos ciclopropano carboxílicos, el ácido crisantémico y el ácido pirétrico, y tres alcoholes ciclopentenolonas (retrinas o retrolonas) denominadas piretrolona, cinerolona y jasmolona (Figura 1). Los dos ácidos carboxílicos diferencian a las piretrinas en las series numeradas, correspondiendo la

serie I a los crisantematos y la serie II a los piretratos. El contenido en crisantematos y piretratos del extracto de *pyrethrum* es aproximadamente el mismo; sin embargo, las piretrinas están en una proporción superior a las cinerinas y éstas, a su vez, se encuentran en mayor proporción que las jasmolinas, representando estas moléculas un 73, 19 y 8% del total, respectivamente (HEAD, 1973). Las piretrinas muestran un poder insecticida superior a las jasmolinas y cinerinas, siendo además la piretrina I el componente con mayor poder insecticida, mientras que la piretrina II presenta mayor capacidad de inmovilización de insectos (CASIDA *et al.*, 1983).

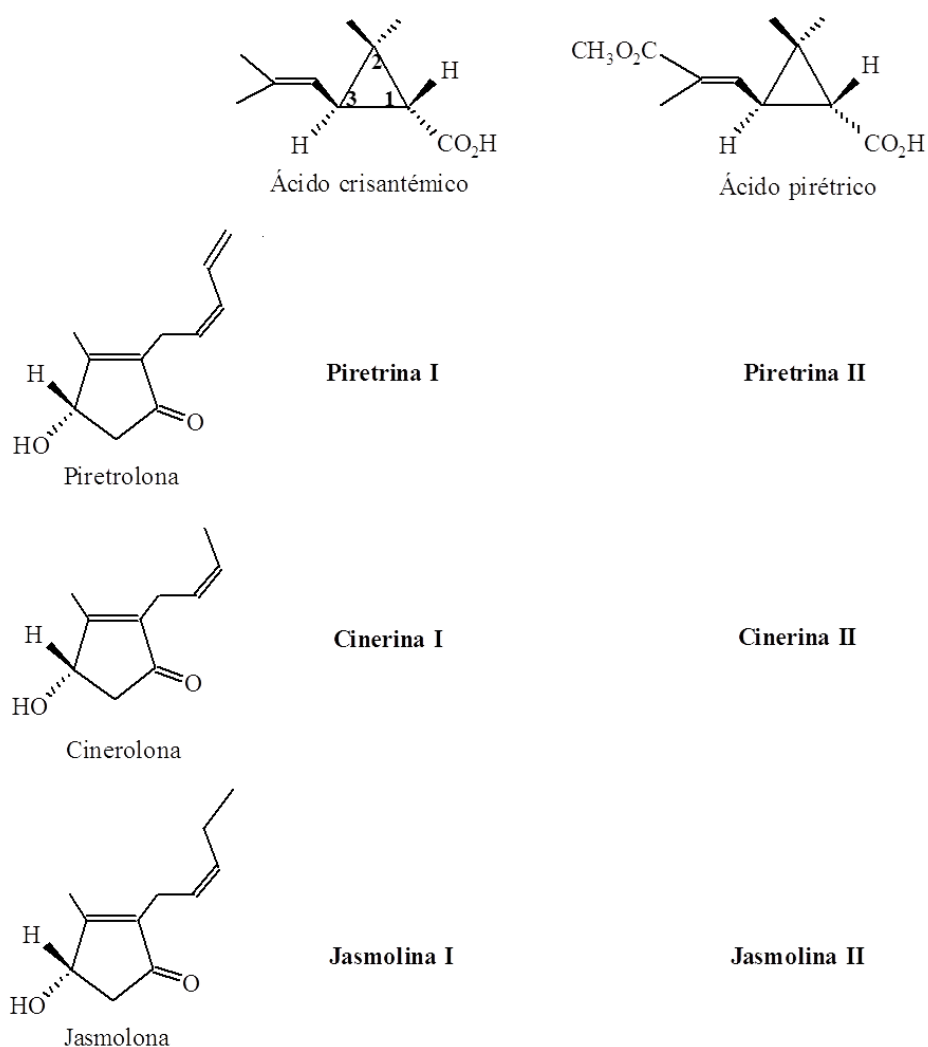


Figura 1. Estructura química de los constituyentes ácidos y alcoholes de las piretrinas naturales y el nombre de los seis ésteres conocidos colectivamente como piretrinas

3.2. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LAS PIRETRINAS: PIRETROIDES

A pesar de la elevada eficacia insecticida de las piretrinas, su amplio espectro, su baja toxicidad en mamíferos y corta persistencia de sus residuos de las piretrinas, presentan inestabilidad química, se descomponen rápidamente por fotodegradación (CHEN y CASIDA, 1974), lo que las hace en la mayoría de las ocasiones inadecuadas como productos fitosanitarios y zoonosanitarios para el control de plagas de vegetales y como antiparasitario de animales, por lo que surge el desarrollo de compuestos de síntesis de derivados de las piretrinas con el objetivo de conseguir compuestos con mayor fotoestabilidad. Dicha labor comenzó prácticamente en el momento del descubrimiento de la actividad insecticida de las piretrinas (STAUDINGER y RUZICKA, 1924), aunque el primer trabajo que originó un piretroide con un cierto éxito comercial se publicó transcurridos 25 años.

Los piretroides sintéticos se optimizaron desde el punto de vista estructural hacia la mitad del siglo XX. La mejora en la vía de síntesis del ácido crisantémico condujo a la síntesis de los primeros piretroides con demostrada actividad insecticida: aletrin y bioaletrin (SCHECHTER *et al.*, 1949). Ambos piretroides son ésteres de la aletrolona racémica (2-alil-3-metil-ciclopent-2-eno-4-ol-1-ona) y del ácido crisantémico *cis*, *trans* o (1*R*)-*trans*, respectivamente. Estos primeros piretroides fueron valorados por sus efectos letales sobre insectos voladores y su actividad sobre otras especies, aunque no presentaron gran interés debido a su elevado coste de síntesis y a una inestabilidad química por fotodegradación (CHEN y CASIDA, 1974).

El descubrimiento de nuevos alcoholes sintéticos de elevada actividad, condujo a la síntesis de otros crisantematos como el tetrametrin (alcohol derivado de la N-hidroximetilftalimida), resmetrin (alcohol 5-bencil-3-furilmetílico) y el fenotrin (alcohol 3-fenoxibencílico). Estos piretroides se utilizan como mezcla de isómeros (1*RS*)-*cis*,

trans o bien como isómero (1R)-*trans*, en cuyo caso se le añade al nombre el prefijo “bio”. El bioresmetrin, presenta un valor de la razón dosis letal cincuenta (DL_{50}) en rata (vía oral)/ DL_{50} en mosca (vía tópica) superior a la de cualquier otro insecticida conocido hasta entonces, incluyendo las piretrinas naturales (ELLIOT, 1971). Estos compuestos muestran una actividad insecticida más potente que los anteriores, y todos ellos contienen grupos carbonilo, bien en la parte ácida o bien en la parte alcohólica de la molécula. Estos crisantematos se utilizan como insecticidas de uso doméstico y en uso ganadero, pero tienen un uso limitado como productos fitosanitarios debido a que sufren una fotodegradación relativamente rápida.

La potencia insecticida y la estabilidad química se incrementaron con la introducción de alcoholes bencílicos sustituidos, de los cuales los alcoholes fenilbencílicos eran los más interesantes, y además con la sustitución del hidrógeno del átomo carbono situado en posición α al carbono bencílico por un grupo ciano (CN) se obtenían compuestos con una mayor potencia insecticida. Así se obtuvo el fenpropatrin, primer piretroide fotoestable de uso agrícola, aunque no fue el primero comercializado de este grupo. Realmente no se trata de un crisantemato, ya que la parte ácida es el ácido 2, 2,3,3-tetrametil ciclopropano carboxílico. Posteriormente en 1973, se sintetizó el permetrin (Figura 2), crisantemato derivado del alcohol 3-fenoxibencílico no sustituido en posición α , que presenta un grupo diclorovinilo en la parte ácida de la molécula (ELLIOT *et al.*, 1973).

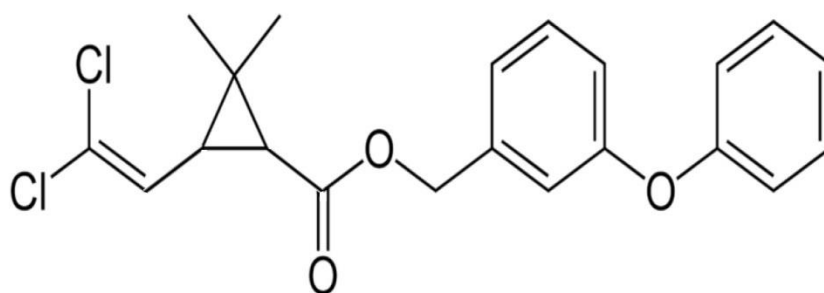


Figura 2. Estructura química del piretroide Tipo I permetrin

La potencia insecticida se mejoró sensiblemente mediante la síntesis de otros ésteres de alcoholes α -ciano-fenoxibencílicos, llegándose a la síntesis de dos nuevos piretroides, cipermetrin (derivado α -ciano del permetrin) y deltametrin (Figura 3), que presenta un grupo dibromovinilo en la parte ácida.

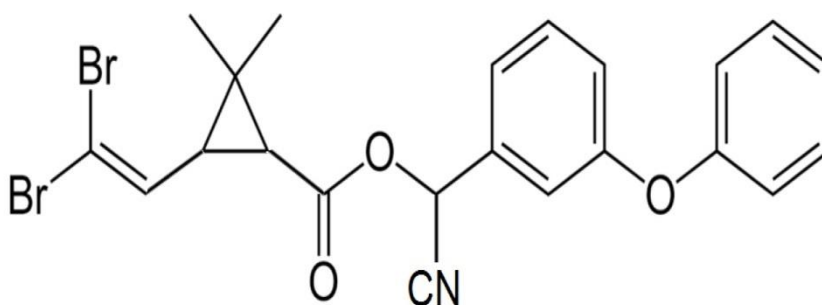


Figura 3. Estructura química del piretroide Tipo II deltamethrin

También en esta época en Japón se sintetizó el fenvalerato, éster del ácido clorofenilacético y el alcohol α -ciano-3-fenoxibencílico, siendo éste el primer piretroide fotoestable comercializado. Como consecuencia de la fotoestabilidad demostrada de estos α -ciano compuestos, se estudió la actividad de estos piretroides sobre especies de artrópodos muy diversas, demostrando ser potentes insecticidas de contacto, de amplio espectro y con una gran variedad de aplicaciones (BREESE, 1977); conforme la fotoestabilidad aumentaba también incrementaba la actividad residual de estos insecticidas, que se prolongaba durante varias semanas (CASIDA *et al.*, 1983).

La síntesis de varios compuestos continuó y así un equipo de investigadores americanos investigó los ésteres de series de ácidos ciclopropano carboxílicos espiro-sustituídos con el alcohol 3-fenoxibencílico y su derivado α -ciano (BROWN y ADDOR, 1979). El primero de estas características fue el cipotrin (DAVIS y SEARLE, 1977), utilizado en medicina veterinaria como acaricida. En la década de los años 80 se desarrollaron una serie de piretroides α -ciano-3-fenoxibencil derivados, tales como el

flucitrinato, fluvalinato, ciflutrin y flumetrin, los cuales introducen diferentes halógenos en el sustituyente en posición 3 del ciclopropano, piretroides hoy en día de gran utilización comercial.

Relación estructura-actividad

Con los datos que tenemos actualmente, podemos esquematizar que existen una serie de características estructurales que reúnen los piretroides, características que les confieren su actividad insecticida, independientemente de la estructura del resto de la molécula o de las especies de insectos utilizadas en los ensayos de eficacia.

Se conoce que la actividad está fuertemente ligada a la mitad ácido ciclopropano carboxílico con un carbono asimétrico en posición C 1 y la presencia de dos grupo-metil en posición C 2. Los sustituyentes en la posición C 3 del anillo ciclopropano, bien en posición *cis* o *trans*, no son un requisito absoluto, solo la presencia de un doble enlace (o cadena insaturada) confiere una alta actividad insecticida así como compuestos más fotoestables (Figura 1) (BARTHEL, 1961; BARLOW *et al.*, 1971; LAWRENCE y CASIDA, 1982). La modificación del componente alcohólico mejora la actividad insecticida y la fotoestabilidad. Se demostró que los alcoholes tipo ciclopentenolona de las piretrinas podían ser reemplazados por otras muy diversas estructuras alcohólicas encontrándose finalmente que el alcohol 3-fenoxibencílico originaba ésteres de alta actividad y muy fotoestables (ELLIOT, 1971; ELLIOT *et al.*, 1973).

La introducción de un grupo α -ciano en la configuración S del alcohol 3-fenoxibencílico originó un compuesto de actividad excepcionalmente alta y permitió descubrir el deltametrin, piretroide con una DL_{50} para insectos del orden de 0,03 mg/kg (ELLIOT *et al.*, 1974). Los piretroides α -ciano presentan diferencias de toxicidad entre enantiómeros, siendo más tóxicos aquellos cuya fracción alcohólica presenta

configuración *S* en el carbono en posición α (DAVIES, 1985; APPEL *et al.*, 1994). Finalmente, destacaremos que los átomos de elementos halógenos presentes en algunos de los piretroides sintéticos (fenflutrin, cialotrin, etc.) contribuyen a una mayor estabilidad, lo que resulta en una mejora de la actividad residual frente a insectos.

La degradación biológica, física y química es mucho menor en los piretroides que en las piretrinas (BRADBURY y COATS, 1989). Con respecto a las propiedades fisicoquímicas de los piretroides, éstas también difieren bastante de las de las piretrinas. La hidrosolubilidad es mucho menor, del orden de 10 a 80 ng/mL, la lipofilia es superior y los coeficientes de reparto octanol/agua varían entre 10^5 y 10^6 .

3.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN

La primera demostración científica que indicaba que las piretrinas naturales, predecesoras de los insecticidas piretroides sintéticos, modificaban la actividad del sistema nervioso fue observada por FUJITANI (1909), quién aisló el extracto *pyrethrum*, una sustancia amarilla y viscosa. Sus resultados de experimentos en corazón y en preparaciones musculares de ranas y en varias especies animales, por ejemplo, en insectos, peces y mamíferos, indicaban que un éster relativamente inestable del extracto de *pyrethrum* producía excitación y parálisis, efectos ligados al sistema neuromuscular y nervioso (FUJITANI, 1909). Sin embargo, no fue antes de la mitad de este siglo cuando se describieron los efectos de las piretrinas naturales sobre la actividad de preparaciones nerviosas de artrópodos (LOWENSTEIN, 1942; WELSH y GORDON, 1947; SCHALLEK y WIERSMA, 1948; YAMASAKI y ISHHII, 1952; LALONDE y BROWN, 1954).

Una de las primeras informaciones del mecanismo de acción del insecticida aletrín se obtuvo a través de registros intracelulares del potencial de acción en axones

gigantes de cucaracha (NARAHASHI, 1962). Detalles de los efectos relacionados con la estructura de los piretroides en la actividad eléctrica de varias preparaciones nerviosas de la langosta del desierto fueron obtenidas hace dos décadas (CLEMENTS y MAY, 1977). Aunque los estudios en invertebrados han representado la mayor contribución para el actual conocimiento del mecanismo de acción de los piretroides, los efectos neurotóxicos básicos en el sistema nervioso están confinados en vertebrados. En síntesis, los principales efectos fisiológicos originados por piretroides quedan expuestos a continuación.

Efecto sobre los canales iónicos voltaje-dependientes

Existe evidencia de que los canales de sodio voltaje-dependientes del sistema nervioso constituyen el lugar primario de acción de los insecticidas piretroides (α -ciano y no α -ciano) tanto en insectos como en mamíferos (NARAHASHI, 1962; NARAHASHI, 1985; CHINN y NARAHASHI, 1986; NARAHASHI, 1996; ZLOTKIN, 1999). Los estudios de *voltage clamp*, realizados con preparaciones de células nerviosas de vertebrados, han demostrado que los piretroides alteran profundamente los cambios conformacionales de los canales de sodio voltaje-dependientes en membranas excitables. Se ha observado que los piretroides muestran alta afinidad por estos canales en su estado de reposo y que esta afinidad aumenta cuando el canal está abierto (DE WEILLE *et al.*, 1988; BROWN y NARAHASHI, 1992; SALGADO y NARAHASHI, 1993). Otros estudios realizados con bloqueantes que actúan a diferentes niveles de los canales de sodio voltaje-dependientes (LUND y NARAHASHI, 1982; YAMAMOTO *et al.*, 1986; DE WEILLE *et al.*, 1988; TAKEDA y NARAHASHI, 1988) pudieron deducir que los piretroides no ejercen su acción en el interior del canal, sino que se disuelven en la fase lipídica de la membrana nerviosa y así acceden a la estructura del canal encargada de abrirlo (NARAHASHI, 1996).

La unión de los piretroides a los canales de sodio voltaje-dependientes provoca una apertura prolongada del canal. La prolongación de la corriente del ion sodio provoca un potencial posterior a la despolarización de la membrana celular. Cuando un nuevo potencial de despolarización alcanza el umbral de excitación, puede iniciarse una actividad neuronal repetitiva en diversas regiones del sistema nervioso. Específicamente, los piretroides inhiben la transición de los canales de sodio voltaje-dependientes a su estado inactivo y no conductor (VAN DEN BERCKEN y VIJVERBERG, 1980; VIJVERBERG *et al.*, 1982a; RUIGT *et al.*, 1987; DE WEILLE y LEINDERS, 1989; NARAHASHI, 1996). Los piretroides Tipo I y Tipo II han mostrado características importantes en su acción sobre los canales de sodio voltaje-dependientes (VIJVERBERG Y VAN DEN BERCKEN, 1990; NARAHASHI, 1996). Los piretroides Tipo I causan en los canales de sodio voltaje-dependientes descargas neuronales (sensoriales, motoras) repetitivas y un post-potencial negativo prolongado, así como ligeros incrementos continuos en la activación del flujo de iones sodio (JOY, 1994). Por su parte, los piretroides Tipo II son más potentes pero de acción más lenta que los piretroides Tipo I. La prolongación del flujo de sodio a través de los canales de sodio voltaje-dependientes es mayor tras la exposición a los piretroides Tipo II que a los de Tipo I. Además, los piretroides Tipo II ralentizan la repolarización de los canales de sodio voltaje-dependientes en mayor medida que los de Tipo I, conduciendo a una despolarización persistente de la membrana de la célula neuronal, lo que ocasiona el bloqueo de la conducción nerviosa (NARAHASHI *et al.*, 1998). Esta continua acción despolarizante da lugar a un aumento en el número de descargas repetidas lo que producirá un efecto neurotóxico más consistente (VIJVERBERG *et al.*, 1982b; HOLLOWAY *et al.*, 1989; VIJVERBERG Y VAN DEN BERCKEN, 1990).

La acción de los piretroides sobre los canales de sodio es inversamente proporcional a la temperatura corporal. El tiempo de prolongación de la corriente de sodio, que conlleva un incremento de los impulsos nerviosos repetitivos, disminuye al aumentar la temperatura y se incrementa al disminuirla (VIJVERBERG *et al.*, 1983; VIJVERBERG y DE WEILLE, 1985). Esto constituye una de las bases de la toxicidad selectiva de los piretroides hacia los insectos frente a los mamíferos (SONG y NARAHASHI, 1996).

Estos cambios en la cinética de los canales de sodio voltaje-dependientes conducen a una despolarización de la membrana y a un incremento del potencial postdespolarizante. Todas estas alteraciones serían las responsables de los síntomas de intoxicación tales como hiperexcitación, hipersensibilidad, temores y convulsiones (VAN DEN BERCKEN y VIJVERBERG, 1980; VIJVERBERG *et al.*, 1982b; NARAHASHI, 1985; RUIGT *et al.*, 1987; DE WEILLE y LEINDERS, 1989; VIJVERBERG y VAN DEN BERCKEN, 1990). Además, una apertura prolongada de estos canales causa modificaciones en la transmisión sináptica y descargas masivas de las neuronas sensoriales, lo que constituye el origen de la parestesia facial característica observada en el hombre tras la exposición a piretroides, principalmente a los α -ciano (NARAHASHI, 1996).

Los insecticidas piretroides actúan principalmente sobre los canales de sodio voltaje-dependientes, pero otros canales iónicos en el sistema nervioso también son sitios de acción de los piretroides. El piretroide Tipo II cipermetrin altera la cinética y flujo de calcio por la inhibición de canales de calcio voltaje-dependientes (MEIJER *et al.*, 2014), que regula las proteínas quinasas y fosfatasas, enzimas clave implicadas en las vías de transducción de señales. El flujo de calcio es mediado por el inositol trifosfato mediante la calcineurina (proteínas que controlan eventos intracelulares en

células eucariotas). Cipermetrin es un fuerte inhibidor de la calcineurina, debido a ello se reduce el flujo de calcio intracelular neuronal y en consecuencia disminuye la liberación de neurotransmisores (ENAN Y MATSUMURA, 1992; WU *et al.*, 2005). Los canales de calcio voltaje-dependientes cumplen un papel fundamental sobre la excitabilidad de las células nerviosas, la homeostasis del calcio, la señalización sináptica y la modulación de la expresión génica (CATTERALL, 2000; DOLMETSCH *et al.*, 2001; MCROY *et al.*, 2001; PEREZ-REYES, 2003). Otro lugar de acción de los insecticidas piretroides Tipo II son los canales de cloruro voltaje-dependientes y el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA). Los piretroides como cipermetrin bloquean los canales de cloruro voltaje-dependientes e inhibe la recaptación de cloruro dependiente de GABA (BLOOMQUIST y SODERLUND, 1985; RAY *et al.*, 1997), lo que conduce a la hiperexcitabilidad. Los piretroides también alteran la actividad de los canales de potasio voltaje-dependientes y el transporte del ion de potasio a través del sinaptosoma, lo que finalmente conduce a neurotoxicidad (RAO y RAO, 1997; MURAKOSHI y TRIMMER, 1999). El flujo de potasio es uno de las principales actividades de cipermetrin, lo que causa efectos neurotóxicos (TIAN *et al.*, 2009).

Actividad nerviosa periférica

Se ha sometido a estudio la capacidad de una serie de piretroides para inducir actividad repetitiva en distintas partes del sistema nervioso periférico de la rana. Los insecticidas piretroides estudiados incluyen piretroides Tipo I o no α -ciano (aletrin, resmetrin, fenotrin, permetrin, fenflutrin y el análogo clorovinilo del tetrametrin) y piretroides Tipo II o α -ciano (cifenotrin, cipermetrin, fenpropatrin, fenvalerato, deltametrin y lambda-cialotrin).

En órgano sensorial de la rana, los piretroides inducen una actividad repetitiva, es decir, la duración de los trenes de impulsos nerviosos en presencia de piretroides registrada en el órgano sensorial lateral, varía considerablemente dependiendo de la estructura química del piretroide (VIJVERBERG *et al.*, 1982a). Los piretroides no ciano inducen trenes de impulsos nerviosos cortos, que contienen no más de una docena de impulsos nerviosos repetitivos. Por el contrario, los piretroides α -ciano, producen trenes de larga duración que contienen cientos a miles de impulsos nerviosos repetitivos. Además, la duración de los trenes de impulsos nerviosos inducidos por los piretroides no ciano así como los α -ciano en el órgano sensorial aumenta considerablemente cuando desciende la temperatura, efecto que revierte al aumentar la temperatura. El tiempo de aparición de la actividad repetitiva varía enormemente para los distintos piretroides a niveles de concentración micromolares.

En nervios periféricos de rana, los piretroides Tipo I ó no ciano también producen descarga repetitiva. Esto se ha observado en fibras nerviosas sensoriales y en los terminales nerviosos motores pero no en las partes proximales de las fibras nerviosas motoras (EVANS, 1976; WOUTERS *et al.*, 1977).

Los efectos de los piretroides sobre las características de la unión-ligando del receptor acetilcolina (Ach)-canal iónico, han llegado a sugerir que estos insecticidas retrasan o desensibilizan los canales iónicos acoplados al receptor Ach-nicotínico (SHERBY *et al.*, 1986). Estudios recientes con “voltage clamp” muestran que concentraciones relativamente altas de piretroides sobre el complejo receptor Ach postsináptico-canal iónico en células de neuroblastoma de ratón, reducen la amplitud sin afectar la cinética de la respuesta de la Ach. Este efecto en la corriente de entrada inducida por Ach parece no ser específico ya que es producido por isómeros con actividad insecticida y también no insecticida. Efectos similares fueron observados

sobre la respuesta mediada por receptores serotoninérgicos acoplados a canales iónicos (OORTGIESEN *et al.*, 1989). Los datos publicados hasta el momento indican que los efectos de los piretroides sobre los receptores acoplados a canales iónicos son principalmente indirectos y no contribuyen significativamente a los síntomas excitatorios asociados con la exposición a piretroides.

Efectos sobre neurotransmisores

ANADÓN *et al.* (1987) describieron un mecanismo farmacológico de la transmisión neuromuscular en conducto deferente aislado de cobayo tratado con el piretroide decametrin, demostrándose que este piretroide originaba una reducción de la sensibilidad profunda α_2 -adrenérgica a nivel presináptico, lo cual puede conducir a un aumento de la liberación de norepinefrina (NE). La relación entre la sensibilidad presináptica del receptor alterado y la liberación de NE por estimulación simpática puede ser importante y el estudio de este hecho puede proporcionar un mayor conocimiento en otros procesos similares que probablemente también ocurran en el sistema nervioso central. Siguiendo esta investigación MARTÍNEZ-LARRAÑAGA *et al.* (2003) observaron que los piretroides Tipo II producen un efecto de depleción del neurotransmisor serotonina y de su metabolito en regiones cerebrales de ratas.

Los piretroides Tipo II ó α -ciano aumentan la liberación del ácido γ -amino butírico (GABA) y NE en sinaptosomas de cerebro de mamíferos (NICHOLSON *et al.*, 1983, DOHERTY *et al.*, 1986, BROOKS y CLARK, 1987). La liberación de GABA y NE inducida por los piretroides α -ciano es inhibida por tetrodotoxina, toxina que bloquea selectivamente los canales de Na, así como aquellos modificados por piretroides (NICHOLSON *et al.*, 1983, DOHERTY *et al.*, 1987). Los piretroides Tipo I ó no α -ciano, no parecen tener este efecto. Por lo contrario, la liberación de NE

producida por piretroides ciano está correlacionada con el grado en el que la corriente de Na se prolonga por estos piretroides (BROOKS y CLARK, 1987).

El sistema nervioso simpático constituye una fuente periférica de liberación de NE sensible a piretroides ciano (CHANH *et al.*, 1981). La liberación de acetilcolina y dopamina en músculo estriado de conejo aumenta por la acción de isómeros con actividad insecticida tipo fenvalerato pero no por aquellos sin actividad insecticida y este efecto es inhibido también por tetrodotoxina. Sin embargo, el fenvalerato no afecta la liberación de estos transmisores en hipocampo de conejo, por lo que se sugiere que existen diferencias regionales en la sensibilidad a los piretroides ciano (EELLS Y DUBOCOVICH, 1988).

Los piretroides α -ciano tipo cipermetrin y deltametrin, producen un aumento en el nivel de GMPc pero no de AMPc en cerebro de rata (ALDRIDGE *et al.*, 1978; LOCK y BERRY, 1980). Este efecto que tiene lugar particularmente en cerebelo parece estar asociado con la duración de los síntomas motores, y se considera secundario al desarrollo de los signos tóxicos (BRODIE y ALDRIDGE, 1982; BRODIE, 1983).

En general se admite que la liberación de neurotransmisores en presencia de piretroides es un efecto secundario de la modificación de los canales de Na.

Efectos sobre cerebro y médula espinal

Los diferentes síndromes tóxicos observados inicialmente en rata tras administración intravenosa de piretroides ciano y no ciano sugieren la hipótesis de que ambos tipos de piretroides causan diferentes efectos en el sistema nervioso central y periférico (VERSCHOYLE y ALDRIDGE, 1980). Se ha demostrado que los dos tipos diferentes de signos motores inducidos por piretroides en rata se originan a nivel de la médula espinal (BRADBURY *et al.*, 1983; GRAY y RICKARD, 1982). Los estudios

electrofisiológicos de los efectos de los piretroides no ciano y ciano sobre la actividad eléctrica en médula espinal de rata y conejo demuestran una excitabilidad aumentada de las interneuronas espinales, que se asemeja a la producida en los nervios periféricos (CARLTON, 1977; SMITH, 1980; STAATZ-BENSON y HOSCO, 1986). Un hallazgo adicional fue que el cis-permetrin (piretroide no ciano), pero no el deltametrin (piretroide ciano), facilitaba enormemente las descargas polisinápticas, y se sugiere que esta facilitación es la causa de la mayor hiperexcitabilidad producida por los piretroides no ciano (STAATZ-BENSON y HOSCO, 1986).

El electroencefalograma (EEG) registrado en ratas tratadas con dosis elevadas de cismetrin y de deltametrin revela que, sólo los piretroides ciano, producen descargas epileptiformes generalizadas que pueden ser provocadas por una estimulación sensorial, como por ejemplo un sonido. Al mismo tiempo, se reduce la amplitud de los potenciales inducidos principalmente por vía somatosensorial y auditiva. Los piretroides no ciano, originan pequeñas alteraciones en el EEG y en la amplitud de los potenciales inducidos, a pesar de la presencia de signos tóxicos agudos; no obstante, posteriormente sí aparecen componentes anormales en el potencial inducido auditivamente y una respuesta aumentada (RAY y CREMER, 1979; RAY, 1980; RAY, 1982). Aparentemente, los piretroides pueden incrementar la excitación así como la inhibición en diferentes regiones del sistema nervioso central.

Efectos sobre el comportamiento

En la rata, los piretroides no α -ciano aumentan el reflejo de alarma acústico pero no se afecta la latencia de esta respuesta. Este efecto se produce en ausencia de signos tóxicos visibles. Por el contrario, los piretroides ciano producen efectos variables sobre el reflejo de alarma así como sobre su latencia y un efecto directo sobre el

músculo. Estos efectos tienen un inicio y una recuperación rápidos. Las diferencias observadas entre los efectos sobre el comportamiento de los piretroides no ciano y ciano podrían estar relacionadas con sus diferentes efectos sobre el sistema nervioso sensorial (por ejemplo, los potenciales inducidos auditivamente) y sobre músculo, que anteriormente se han mencionado (CROFTON y REITER, 1984; CROFTON y REITER, 1988; TILSON *et al.*, 1985; HIJZEN y SLANGEN, 1988; HIJZEN *et al.*, 1988).

El valor práctico de estos efectos sobre el comportamiento para la evaluación del potencial neurotóxico de los piretroides es difícil de estimar. Aunque parece posible distinguir a groso modo entre los efectos de bajas dosis de piretroides ciano y no ciano, los resultados de estos efectos sobre el comportamiento deben ser validados comparándolos con los efectos de otras clases diferentes de compuestos neurotóxicos.

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas en mamíferos a la intoxicación por piretroides han sido revisadas por CASIDA *et al.* (1983), GRAY y SODERLUND, (1985), NRCC (1986). En general, la intoxicación aguda en ratas produce alteraciones en los parámetros cardio-respiratorios y bioquímicos sanguíneos (aumento de glucosa y lactato en sangre, aumento de adrenalina y noradrenalina en plasma, disminución del pH arterial, aumento del consumo de oxígeno) generalmente coincidentes con un aumento en la actividad muscular durante las convulsiones. También se han descrito numerosos cambios neuroquímicos (elevada utilización de la glucosa en cerebro, incremento en los niveles de GMPc en cerebelo, disminución de la Ach en cerebro) asociados con una actividad neuronal-cerebelar elevada. Estos cambios reflejan una respuesta a la acción tóxica de los piretroides (GRAY y SODERLUND, 1985). Estudios electrofisiológicos en mamíferos han sido realizados para describir los efectos en nervios sensoriales y las respuestas sobre el sistema nervioso central. Generalmente, los resultados de estos

estudios han sido similares a los obtenidos con preparaciones de invertebrados y anfibios (GRAY y SODERLUND, 1985).

Efectos cardiovasculares

Los piretroides inducen efectos cardiovasculares en mamíferos, principalmente los piretroides ciano. Entre estos efectos se han descrito fundamentalmente, dependiendo de la dosis y de la vía de aplicación, un aumento de la presión arterial, efecto mediado por un incremento en la liberación de catecolaminas periféricas y un efecto inotrópico positivo directo (CHANH *et al.*, 1980; FORSHAW y BRADBURY, 1983; BRADBURY *et al.*, 1983).

Efectos sobre ATPasas

La actividad de las enzimas ATPasas, tanto en vertebrados como en invertebrados, se inhibe por concentraciones elevadas de piretroides en grado variable según el compuesto, la especie animal y los tejidos estudiados (SCHNEIDER, 1975; DESAIAH *et al.*, 1975; DOHERTY *et al.*, 1981, CLARK y MATSUMURA, 1982; CLARK y MATSUMURA, 1987; SAHIB *et al.*, 1987). Sin embargo hay resultados contradictorios, existen datos por ejemplo con el deltametrin donde se han observado efectos estimulantes sobre la actividad de la ATPasa Ca/Mg (JONES y LEE, 1986). Por otra parte, en otro estudio, se ha demostrado que el deltametrin no afecta a la ATPasa Na/K en cerebro de rata ni en corazón de cobayo (BERLIN *et al.*, 1984). Por tanto, no se sabe si los piretroides interaccionan directamente o indirectamente sobre las ATPasas. Debido a la variabilidad de resultados y a su pobre estereoselectividad, la significancia toxicológica de estos efectos es cuestionable.

Efectos sobre enzimas citocromo P450

Los primeros estudios sobre el efecto de los piretroides sobre las enzimas metabolizantes de xenobióticos datan del año 1973. En aquel entonces SPRINGFIELD *et al.* (1973) demostraron que el extracto del *pyrethrum* se comportaba como un inductor débil del metabolismo de xenobióticos. En ratas, dosis orales de 500 mg/kg p.c./día durante 4 días, provocaban hepatomegalia que iba acompañada de un incremento en la actividad de diversas enzimas hepáticas. Posteriormente, CARLSON y SCHOENIG (1980) demostraron que el permetrin (80:20; *cis: trans*) 50 mg/kg p.c. /día por vía oral, también producía un incremento de la actividad del citocromo P450 (CYP) y de la enzima NADPH-citocromo *c* (P450) reductasa. ANADÓN *et al.* (1988) también señalan que el permetrin (piretroide no α -ciano) parece poseer un efecto inductor enzimático de enzimas P450 (CYP), efecto dosis-dependiente.

Un efecto inductor de enzimas CYP por piretroides Tipo I y Tipo II ha sido demostrado (DELESCLUSE *et al.*, 1998; MORISSEAU *et al.*, 1999; HEDER *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2009). Aunque enzimas CYP normalmente generan metabolitos con una menor actividad biológica y representan una detoxicación, existen ejemplos de enzimas CYP que catalizan la activación metabólica de compuestos químicos inertes a compuestos electrófilos (IOANNIDES y PARKE, 1990; GUENGERICH *et al.*, 1991; HINSON *et al.*, 1994). Se ha demostrado, para diversos compuestos, que existe una relación entre el metabolismo mediado por CYP enzimas y su toxicidad (NYARKO *et al.*, 1997; GONZALEZ y GELBOIN, 1994). Cada vez más, existen estudios que implican a los piretroides con el metabolismo oxidativo de xenobioticos. Se ha demostrado que el piretroide Tipo II ciflutrin induce las subfamilias CYP2E, CYP1A y CYP4, así como también incrementa la β -oxidación de la enzima palmitoil-coenzima A y la actividad de la enzima carnitina acetyltransferasa, lo que soporta clasificar también

al piretroide ciflutrin como un compuesto proliferador de peroxisomas (ANADÓN *et al.*, 2013b). Recientemente, MARTÍNEZ *et al.* (2018) examinan el efecto del piretroide Tipo II lambda-cialotrin sobre actividades de diversas CYP enzimas en microsomas hepáticos, así como también sobre la expresión de genes CYP, sobre marcadores de estrés oxidativo (ROS y actividades de enzimas antioxidantes), sobre la expresión de genes proinflamatorios y mediadores de apoptosis en hígado de rata tratadas con dicho piretroide. Los resultados demostraron que lambda cialotrin (2, 4 y 8 mg/kg p.c., durante 6 días) de forma dosis-dependiente incrementa las actividades hepáticas de las enzimas CYP1A1, CYP1A2, CYP 2B1/2, CYP2A1, y CYP3A1/2. De manera similar, lambda-cialotrin (dosis de 4 y 8 mg/kg p.c., durante 6 días), de manera dosis dependiente, aumentó los niveles de mRNA CYP1A1, 1A2, 2A1, 2B1, 2B2, 2E2, 3A1, 3A2 y 4A1, así como también la expresión de los genes IL-1 β , NF κ B, Nrf2, P53, caspase-3 y Bax. El análisis por PCR array demostró que de 84 genes examinados, 18 genes presentaron alteraciones (13 up-regulados). Los genes mayormente (3 veces) up-regulados incluyeron ALDH1A1, CYP2B1, CYP2C8 y CYP2D4.

Efectos sobre el estrés oxidativo

Cada vez más está aumentando la evidencia de que entre los efectos tóxicos de los piretroides se encuentran efectos relacionados con el estrés oxidativo (WANG *et al.*, 2016). Se viene sugiriendo que el piretroide Tipo I permetrin puede inducir estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) todo ello con un papel crítico en la inducción de daño al ADN y proteínas en vertebrados e invertebrados. La influencia del estrés oxidativo, ROS y RNS sobre la neurotoxicidad, inmunotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, efectos sobre la reproducción, genotoxicidad, efectos hematotóxicos, toxicidad en el sistema digestivo y

citotoxicidad asociada con los piretroides esta cada vez mas llamando la atención. Una inadecuada defensa antioxidante, o sobre-producción de radicales libres conducen a estrés oxidativo wque podría ser iniciado por ROS tales como radicales hidroxilo, aniones superoxido y perhidroxi radicales, y por RNS incluyendo oxido nítrico (NO) (ADAMS *et al.*, 2015). Ratas tratadas con permetrin (150 mg/kg p.c. durante 60 días) se observó un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ (33 veces más que el grupo control) y de la actividad del sistema peróxido-mieloperoxidasa de hidrogeno (67 veces más que el grupo control) en neutrófilos polimorfonucleares (GABBIANELLI *et al.*, 2009). Tambien se ha observado que permetrin conduce a una producción de ROS *in vitro* en células de timo aisladas de ratones C57BL/6; permetrin originó un incremento significativo en la generación de $O_2^{\bullet-}$ tras 15 min de exposición (OLGUN y MISRA, 2006). También permetrin puede presentar efectos adversos en animales por la generación de NO (ZHANG *et al.*, 2011). Además permetrin podría disminuir el sistema de defensa antioxidante lo que produciría el daño de macromoléculas celulares tales como el ADN, lípidos y proteínas (WEIDINGER y KOZLOV, 2015). El estrés oxidativo podría inducir la muerte celular por mecanismos de apoptosis o necrosis, este proceso puede involucrar el daño del ADN, incremento de la peroxidación lipídica, y alteraciones proteícas.

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos inductores de neurotoxicidad *in vitro* del piretroide Tipo II deltametrin. En este estudio se observó que deltametrin y su metabolito 4'-OH-deltametrin incrementaron, en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), los niveles de nitritos y la peroxidación lipídica (ROMERO *et al.*, 2012), lo que puede ser atribuido en parte a la disposición y metabolismo del deltametrin (ANADÓN *et al.*, 1996). Otros estudios han confirmado un descenso en el número de neuronas en el hipocampo y la corteza frontal de ratas tras

la administración de deltametrin (CHEN *et al.*, 2012; WU y LIU, 2000). GROSSE *et al.* (2002) observaron que el deltametrin incrementa la liberación de aminoácidos GABA y glutamato en cultivos de neuronas de hipocampo de ratón, contribuyendo al daño neuronal del pesticida. GROMOV *et al.* (1993), evidenciaron que el deltametrin afecta negativamente a la formación y consolidación de la memoria y cuando las lesiones a nivel del hipocampo superan el 75%, la memoria se ve significativamente afectada (STANLEY *et al.*, 2012). Los datos obtenidos nos indican que la administración de deltametrin a las dosis ensayadas favorecería el desarrollo y progresión de un proceso de excitotoxicidad, dado que las alteraciones del perfil bioquímico preceden a las alteraciones estructurales a nivel del SNC (DERE *et al.*, 2007).

En general los antioxidantes disminuyen la generación de ROS y reducen el estrés oxidativo inducido por los piretroides. Un mejor conocimiento de los mecanismos de detoxicación de los piretroides puede contribuir al descubrimiento de antídotos eficaces para el tratamiento de la intoxicación por estos plaguicidas.

3.2.2. SIGNOS DE INTOXICACIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los piretroides se clasifican en función de su estructura química y efectos toxicológicos, neurofisiológicos y farmacológicos (VERSCOYLE y ALDRIDGE, 1980; GAMMON *et al.*, 1981).

La observación de los síntomas de intoxicación aguda inducidos por piretroides en mamíferos ha llevado a la clasificación de estos insecticidas en dos clases bien diferenciadas (VERSCOYLE y ALDRIDGE, 1980). Los experimentos realizados en insectos terrestres también han servido para establecer esta clasificación (CLEMENTS y MAY, 1977; GAMMON *et al.*, 1981; GLICKMAN y CASIDA, 1982; LAWRENCE y CASIDA, 1982; RAY, 1982; STAATZ *et al.*, 1982; SCOTT y MATSUMURA, 1983).

En primer lugar se encuentran los denominados piretroides Tipo I que, en roedores (rata), producen en un corto intervalo de tiempo un comportamiento agresivo y un incremento de la irritabilidad, seguido de incoordinación y de un ligero temblor que se va extendiendo por todo el organismo corporal y que culmina con postración y muerte. Este cuadro fue denominado síndrome-T (“tremor”) por VERSCHOYLE y ALDRIDGE (1980) y lo producen piretroides como aletrin, cismetrin (isómero *cis* de la resmetrina) y permetrin. Estos piretroides Tipo I presentan en su molécula una característica común, la ausencia del grupo α -ciano en la parte alcohólica, por ello se conocen o se denominan **“piretroides Tipo I ó no α -ciano”**.

El segundo tipo de piretroides son los denominados piretroides Tipo II, los signos iniciales de intoxicación que originan en roedores (rata) se caracterizan por masticación, incoordinación, hiperactividad y acción de escarbar o amadrigarse, seguido en escasos minutos por salivación profusa, temblor profundo, aumento de la respuesta de alarma y locomoción anormal de las patas traseras. Estos signos conducen a una coreoatetosis, movimientos contorsionados y convulsiones clónicas seguidas de muerte. Este cuadro fue denominado síndrome-CS (“coreoatetosis y salivación”) por VERSCHOYLE y ALDRIDGE (1980). Este segundo tipo de piretroides o piretroides Tipo II, presentan en su molécula un grupo alfa-ciano, por ello se denominan **“piretroides Tipo II ó α -ciano”**.

Estas diferencias en la sintomatología entre los dos Tipos de piretroides, Tipo I y Tipo II, también se han descrito en insectos (cucaracha) (GAMMON *et al.*, 1981) y en anfibios (rana) (VIJVERBERG *et al.*, 1982a). Examinando la intoxicación por piretroides en la rana también se llegó a una clasificación similar de los piretroides (Tipo I y Tipo II) en función de los síntomas producidos (COLE y CASIDA, 1983). En la rana, los piretroides Tipo I (no ciano) producen incoordinación, hiperactividad y

tremor. El síndrome Tipo II, asociado con los piretroides ciano, se caracteriza por extensiones tónicas de las extremidades, salivación y coreoatetosis.

También se han realizado estudios de los signos de intoxicación por piretroides en aves y peces, haciéndose más difícil la diferenciación entre los síndromes Tipo I y Tipo II. La intoxicación por piretroides Tipo II (fenvalerato y cipermetrin) en aves, como la codorniz, incluye hiperactividad, ataxia, locomoción anormal, arqueo y torsión de la cabeza y convulsiones tónicas que finalmente conllevan la muerte (BRADBURY y COATS, 1982; EDWARDS *et al.*, 1986).

En experimentos realizados con peces utilizando piretroides α -ciano y no α -ciano (cipermetrin, fenvalerato y permetrin), se ha observado que los peces son extremadamente sensibles a estos insecticidas mostrando, inicialmente, pérdida de la conducta de aprendizaje y un nadar cercano a la superficie del agua, seguido de hiperactividad, natación errática, contracciones corporales violentas y pérdida de flotación, llegando a la inmovilidad corporal total y muerte (GLICKMAN *et al.*, 1981; HOLCOMBE *et al.*, 1982; BRADBURY *et al.*, 1985; 1987a, 1987b; EDWARDS *et al.*, 1986). De los ensayos de ecotoxicidad realizados con piretroides se deduce que, en general, son compuestos muy tóxicos para el medio ambiente acuático.

No obstante, se ha observado que algunos piretroides ciano tales como la (1R)-*trans*-cifenotrina y la fenpropatrina, producen una combinación de los dos síndromes, denominándose síndrome TS, que se caracteriza por temblor e hipersalivación. Igualmente se ha visto que distintas formas estereoisómeras (*cis* y *trans*) de un mismo piretroide pueden inducir bien el síndrome T o el síndrome CS (VERSCHOYLE y ALDRIDGE, 1980; FORSHAW *et al.*, 1987).

A la vista de lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que los lugares de acción primarios, tanto de los piretroides Tipo I como de los piretroides Tipo II, es el

sistema nervioso central y periférico (VERSCHOYLE y ALDRIDGE, 1980, GRAY y SODERLUND, 1985; STAATZ-BENSON y HOSCO, 1986).

3.2.3. TOXICOCINÉTICA

Existe información limitada en la literatura científica sobre la disposición cinética de los piretroides en mamíferos. Dado que los piretroides son compuestos biodegradables, la mayoría de los estudios descritos en la literatura acogen principalmente el estudio de las diferentes vías metabólicas que sufren estos insecticidas, estudios que han sido dirigidos principalmente a justificar que esta biodegradación les hace merecedores de ser compuestos potencialmente con un menor riesgo que otros insecticidas no biodegradables, tipo organoclorados.

Los estudios toxicocinéticos de los piretroides (absorción, distribución, metabolismo y excreción) no solamente son esenciales para interpretar datos toxicológicos sino también son de gran valor para diseñar posteriores investigaciones.

En general, los estudios toxicocinéticos de piretroides indican que como compuestos de carácter marcadamente lipofílico, presentan una amplia absorción y distribución tisular; los piretroides experimentan una distribución rápida y, exceptuando los depósitos en el tejido adiposo, se metabolizan y eliminan del organismo en un tiempo relativamente rápido en comparación con otros insecticidas (CASIDA *et al.*, 1983). Existe realtiva informacion de una correlacion entre la aparición de manifestaciones neurotóxicas y las concentraciones de diferentes piretroides en sangre y en cerebro (RICHARD y BRODIE, 1985) por lo que es importante en el diseño de las futuras investigaciones establecer el enfoque toxicocinético (TK)/ toxicodinámico (TD). ANADÓN *et al.* (1991, 1996, 2006) han desarrollado estudios cinéticos de diversos piretroides Tipo I y Tipo II evaluando concentraciones plasmáticas y concentraciones en el sistema nervioso central y periférico.

ANADÓN *et al.* (1991) realizaron un estudio en ratas para determinar el perfil toxicocinético del permetrin, piretroide Tipo I ó no α -ciano, tras su administración a dosis únicas de 46 y 460 mg/kg p.c. por vía intravenosa y oral, respectivamente. La absorción tras la administración oral fue lenta y relativamente amplia, con una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de 0,91 h, obteniéndose una biodisponibilidad del 60,69%. Una concentración máxima de 50 $\mu\text{g/mL}$ (C_{max}) de permetrin en plasma se alcanzó a las 3,52 horas (T_{max}). Permetrin se distribuyó ampliamente, atravesando la barrera hematoencefálica y presentando afinidad por el sistema nervioso central. El tiempo en el que se obtuvo la concentración máxima de permetrin en plasma (T_{max}) fue similar al observado en los distintos tejidos nerviosos estudiados (nervio ciático, hipotálamo, hipocampo, caudado, putamen, cerebelo y médula. Las curvas concentración plasmática *versus* tiempo obtenidas presentaban tras su absorción una primera fase de distribución rápida, seguida de una segunda fase de eliminación mas lenta, por lo que se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. Permetrin presenta un aclaramiento plasmático lento (0,058 L/h), independientemente de la vía de administración. La semivida de eliminación fue ($t_{1/2\beta}$) ligeramente inferior tras la administración intravenosa que tras la administración oral, siendo de 8,67 y 12,3 h, respectivamente lo que indica que la eliminación es dependiente del proceso de absorción. Permetrin se metaboliza en rata, detectándose sus dos metabolitos principales (alcohol *m*-fenoxibencílico y ácido *m*-fenoxibencílico) entre las 0,5 y 48 h tras la administración oral, tanto en plasma como en las regiones del sistema nervioso anteriormente mencionadas y en hígado.

Estos mismos autores, posteriormente, han realizado un estudio sobre la toxicocinética del piretroide Tipo II ó α -ciano deltametrin en ratas tras la administración de dosis únicas de 26 mg/kg p.c. por vía oral y 1,2 mg/kg por vía intravenosa

(ANADÓN *et al.*, 1996). Las curvas de las concentraciones plasmáticas *versus* tiempo, tanto del compuesto inalterado como de sus metabolitos, muestran, tras la fase de absorción, un descenso bifásico, ajustándose a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. La absorción de deltametrin tras la administración oral fue rápida e incompleta con una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de 0,61 h. La concentración plasmática máxima de 0,46 µg/mL se alcanzó transcurridos 1,83 h. La biodisponibilidad por vía oral fue de un 14,43 %. Tras la administración intravenosa el volumen aparente de distribución y el volumen de distribución durante el estado estacionario fueron 5,33 y 2,04 L, lo que indica la amplia distribución de deltametrin a los tejidos. Este piretroide, al igual que permetrin en el estudio anteriormente mencionado, se distribuyó rápidamente a las distintas regiones del cerebro. El aclaramiento plasmático de deltametrin mostró un valor de 0,11 L/h, independientemente de la vía de administración utilizada.

Finalmente este mismo grupo de investigación describe el perfil toxicocinético de otro piretroide Tipo II ó α -ciano, lambda-cialotrin (ANADÓN *et al.*, 2006). La absorción de lambda-cialotrin tras la administración oral también fue rápida con una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de 0,87 h. La concentración plasmática máxima de 15,65 µg/mL se alcanzó transcurridos 2,69 h. La biodisponibilidad por vía oral fue de un 67,37%. El piretroide lambda-cialotrin se elimina lentamente del plasma. La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) fue 10,27 y 7,55 h, tras la administración oral y tras la administración intravenosa, respectivamente. El aclaramiento plasmático de lambda-cialotrin mostró un valor de 0,06 L/h, independientemente de la vía de administración utilizada. Este piretroide, al igual que permetrin en el estudio anteriormente mencionado, atraviesa la barrera hematoencefálica, y se detectan cantidades considerables en los tejidos del sistema nervioso central.

Se conoce que los piretroides sufren biotransformación, siendo las fases del metabolismo la ruptura del enlace éster seguido de hidroxilaciones en diferentes posiciones tanto en la estructura molecular completa como en los 2 metabolitos (mitad-acido y mitad-alcohol) obtenidos en la hidrolisis. Posteriormente todos estos metabolitos alcoholes y fenoles sufren conjugación (con ácido glucorónico, sulfato, glicina, taurina y glutamato, principalmente) (COLE *et al.*, 1982; CASIDA *et al.*, 1983; ANGERER Y RITTER, 1997) y los metabolitos conjugados son principalmente eliminados por vía urinaria; la fase de conjugación, es un proceso claro de detoxicación para estos compuestos.

El grupo α -ciano de los piretroides Tipo II se excreta parcialmente como tiocianato en orina. Los intermedios son cianhidrinas inestables que rápidamente son oxidadas, formándose aldehído y ácido cianhídrico (EBEN y THYSEN, 1981).

Las rutas metabólicas de los piretroides son muy similares en insectos y en mamíferos, siendo las esterasas y las monooxigenasas las principales enzimas metabólicas. Sin embargo, la capacidad metabólica de estas enzimas es mayor en mamíferos que en insectos y peces, por lo que los piretroides presentan una toxicidad selectiva y esta es mayor en insectos y en peces. El incremento de la eficacia insecticida conseguido en formulaciones de piretroides con inhibidores específicos de esterasas y monooxigenasas confirma la importancia de la metabolización en la reducción de la toxicidad de estos insecticidas (CASIDA *et al.*, 1983). Por ejemplo, el butóxido de piperonilo, compuesto con acción sinérgica para los piretroides, es un inhibidor clásico del sistema microsomal oxidasa de función mixta; butóxido de piperonilo se utiliza en combinación con piretroides para obtener una acción insecticida más potente.

La hidrólisis del enlace éster en los piretroides es importante para su excreción (RUZO *et al.*, 1978). Esta fase metabólica depende de la estructura del piretroide,

hidrolizándose más rápidamente los isómeros *trans*- y los piretroides no α -ciano; la configuración *R* o *S* también influye en la velocidad de la hidrólisis (SODERLUND y CASIDA, 1977).

El sistema microsomal oxidasa de función mixta está implicado en el metabolismo de los piretroides. Los sitios de oxidación varían dependiendo de la estructura del insecticida. En general, la oxidación se produce en primer lugar en los grupos metilo y en el anillo fenoxi-. Los metabolitos oxidados de ciertos piretroides Tipo II también poseen actividad biológica, por lo que es importante considerar su toxicidad. Ensayos *in vitro* en células SH-SY5Y demuestran que los metabolitos oxidados del delatametrin, 2'-OH- and 4'-OH-deltametrin, son mas toxicos que el deltametrin (ROMERO *et al.*, 2012). El sistema nervioso central no puede ser excluido, en principio, de que intervenga también en el metabolismo de los piretroides. ANADÓN *et al.* (1996) detectaron en diferentes regiones cerebrales niveles del metabolito activo 4-hidroxi-deltametrin con una semivida de eliminación en un rango de 26-40 horas, valores muy similares a los obtenidos para el compuesto inalterado deltametrin.

Hay escasos datos referentes a la posible unión covalente de los piretroides o de sus metabolitos hidroxilados. Estudios de unión a proteínas hepáticas *in vitro* con cismetrin, bioresmetrin y su componente alcohólico, parecen señalar que la unión depende de la formación de un metabolito reactivo, por el momento no caracterizado, ni identificado, aunque se apunta a la posibilidad de formación de un epóxido del componente alcohólico del anillo de furano (HOELLINGER *et al.*, 1985). No cabe duda de que estudios en esta línea son del todo necesarios para la evaluación del riesgo de los piretroides. En el caso del fenvalerato, se ha descrito en estudios a largo plazo en ratones, alteraciones patológicas caracterizadas por microgranulomas microfocales en

ganglios linfáticos, hígado y bazo. En experimentos realizados con los isómeros de fenvalerato, se ha demostrado que los isómeros (2*R*, 5), son los responsables de este efecto. Investigaciones sobre el metabolismo de estos isómeros señalaron que la mitad ácida se unía al colesterol y como consecuencia se originaban estas alteraciones patológicas (OKUNO *et al.*, 1986).

Aunque existe limitada información de la disposición de los piretroides, en general podemos decir que los piretroides por su liposolubilidad una vez en circulación sistémica se distribuyen por difusión en todo el espacio corporal, eliminándose lentamente de la sangre y de los tejidos. La Tabla 1 recoge datos cinéticos ($t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$) de diversos piretroides Tipo I y Tipo II en sangre y en tejido adiposo. Es evidente la necesidad de un mayor conocimiento del perfil toxicocinético de los piretroides, datos importantes a la hora de la evaluación del riesgo de estos insecticidas.

Tabla 1. Semivida de distribución ($t_{1/2\alpha}$) y de eliminación ($t_{1/2\beta}$) en sangre y en tejido adiposo de diversos piretroides tras administración oral en ratas

Sustancia activa	Sangre $t_{1/2\alpha}/t_{1/2\beta}$	Tejido adiposo $t_{1/2\alpha}/t_{1/2\beta}$	Referencia
α -Cipermetrin		2,5 d/17-26 d	HUTSON y LOGAN (1986)
<i>cis</i> -cipermetrin		18,9 d	RHODES <i>et al.</i> (1984)
<i>trans</i> -cipermetrin		3,4 d	RHODES <i>et al.</i> (1984)
Permetrin	12,4 h/17,8 h		ANADÓN <i>et al.</i> (1991)
Deltametrin	2,10 h/38,50 h		ANADÓN <i>et al.</i> (1996)
Lambda-cialotrin	1,88 h/10,27 h		ANADÓN <i>et al.</i> (2006)

Bajo aspectos toxicocinéticos, la acumulación de los compuestos lipofílicos tales como los piretroides es un fenómeno de gran importancia. Cuando un compuesto lipofílico se administra de forma repetida, la sustancia puede sufrir acumulación en

aquellos casos en que la cantidad ingerida es mayor a la cantidad eliminada, es decir cuando la velocidad de la ingesta supera a la eliminada (proceso de saturación). Este es el caso observado en ratas para el piretroide cipermetrin, en el que la concentración sanguínea en el estado estacionario (cuando la cantidad eliminada durante un periodo de dosificación corresponde con la cantidad ingerida) se alcanza a los 28 días de una administración diaria de 2 mg/kg p.c. (RHODES, *et al.*, 1984). Las concentraciones mayores se detectaron en tejido adiposo (1-1,4 µg/g), piel (0,7-1,9 µg/g) e hígado, riñón, glándula adrenal, intestino y ovario (0,4-0,9 µg/g); concentraciones menores se detectaron en músculo, bazo y hueso (0,04-0,07 µg/g) y las concentraciones más bajas se detectaron en el cerebro (<0,013 µg/g) (RHODES, *et al.*, 1984). Este hecho también es observado por los datos publicados por APPEL *et al.* (1994) donde se expresa que tras la administración oral de 2 mg/kg de fluvalinato, las concentraciones en cerebro (rango de 0,001-0,045 µg/g) fueron siempre más bajas que las concentraciones en tejido adiposo (rango de 0,08-1,15 µg/g), de una a tres veces superiores; las concentraciones cerebrales declinan en unos 12 días tras la administración a niveles por debajo del límite de detección, mientras que las concentraciones en tejido adiposo, en este periodo de tiempo, apenas muestran una disminución, lo que parece también indicar que el sistema nervioso central participa en su metabolización.

Los piretroides atraviesan la barrera hematoencefálica y penetran en el sistema nervioso central. Estudios realizados con cipermetrin, permetrin, deltametrin, fenpropatrin y fenvalerato marcados radiactivamente demuestran este hecho. Diversos investigadores observan que cuando se utiliza ¹⁴C como marcaje de la molécula y se efectúa en la mitad ácida o en la mitad alcohólica del piretroide, el lugar del radiomarcaje de la molécula juega un papel importante a la hora de obtener las

concentraciones del piretroide en los tejidos estudiados, tejido adiposo y cerebro total

(Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de piretroides en tejido adiposo y cerebro tras administración oral.

Sustancia y especie animal	Dosis y duración	Radio-marcaje ^{14}C	Tejido	Concentración ($\mu\text{g/g}$) isomero <i>trans</i> /isomero <i>cis</i>	Referencia
Cipermetrin Ratón	7-8 mg/kg p.c. 3d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,16 1,2 0,62 2,9 0,01 <0,005 0,003 0,004	CRAWFORD <i>et al.</i> (1981)
Cipermetrin Rata	200 mg/kg p.c. 7d	Ciclopropil- bencil Ciclopropil- bencil	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	21,2 15,0 <0,2 <0,2	RHODES <i>et al.</i> (1984)
Permetrin Rata	4,4-48 mg/kg p.c. 12d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	<0,025 0,458 0,086 0,618 <0,025 <0,025 <0,025 <0,025	GAUGHAN <i>et al.</i> (1977)
Permetrin Cabra	0,2-0,3 mg/kg p.c. 10 d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,022 0,242 0,018 0,252 0,002 0,006 0,003 0,015	HUNT <i>et al.</i> (1977)
Permetrin Gallina	10 mg/kg p.c. 3d/6d	Ácido Alcohol	Grasa Grasa	0,21 1,03 0,18 1,36	GAUGHAN <i>et al.</i> (1978)
Deltametrin Rata	0,9-1,6 mg/kg p.c. 8d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,059 0,182 0,004 0,02	RUZO <i>et al.</i> (1978)
Deltametrin Ratón	1,7-4,4 mg/kg p.c. 8d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,273 0,115 0,017 ND	RUZO <i>et al.</i> (1979)
Fenpropatrin Rata	2,4-3,8 mg/kg p.c. 7d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,098 0,173 0,002 ND	KANEKO <i>et al.</i> (1987)
Fenpropatrin Rata	18,5-26,8 mg/kg p.c. 7d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,425 1,372 ND ND	KANEKO <i>et al.</i> (1987)
Fenvalerato Rata	7,0 mg/kg p.c. 6d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	1,1 1,4 0,01 ND	KANEKO <i>et al.</i> (1981)
Fenvalerato Raton	0,7 mg/kg p.c. 6d	Ácido Alcohol Ácido Alcohol	Grasa Grasa Cerebro Cerebro	0,72 0,89 0,01 ND	KANEKO <i>et al.</i> (1981)

ND, no detectado

Los piretroides atraviesan la barrera hematoencefálica y presentan afinidad por diversas estructuras del sistema nervioso central. ANADÓN *et al.* (1991; 1996) demostraron niveles altos de permetrin y deltametrin y de sus principales metabolitos en diversas regiones cerebrales alcanzando concentraciones máximas para el caso del permetrin en cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado, corteza frontal e hipotálamo del orden de 1,5-7 veces mayores que las encontradas en plasma; y para el caso del deltametrin la razón $AUC_{\text{tejido}}/AUC_{\text{plasma}}$ fue desde 2,32 en cuerpo estriado a 295,30 en hipotálamo, con valores intermedios en otros tejidos nerviosos.

Las semividas de eliminación ($t_{1/2\beta}$) observadas por los piretroides permetrin y deltametrin en diversas regiones cerebrales están en un rango entre 9-23 h para el permetrin y de 23-40 h para el deltametrin. En ambos casos, el hipotálamo es el que presenta una semivida de eliminación más prolongada (ANADÓN *et al.*, 1991; 1996).

Es evidente que los estudios toxicocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y excreción) no solamente son esenciales para interpretar datos toxicológicos, sino también son de gran valor para diseñar posteriores investigaciones. Con respecto a los datos estrictamente toxicocinéticos existen muy pocas publicaciones en modelos animales y existen datos muy escasos evaluados en el hombre. EADSFORTH y BALDWIN (1983) evaluaron la potencial exposición de cipermetrin en humanos determinando los metabolitos conjugados excretados en la orina. Estos investigadores observan que al igual que sucede en animales de experimentación, el piretroide cipermetrin sufre ruptura del enlace éster y los metabolitos de las dos mitades ácido y alcohol se eliminan de forma conjugada en orina.

3.2.4. TOXICIDAD EN MAMÍFEROS

El mecanismo primario de acción de los piretroides es el sistema nervioso. En la actualidad existe amplia información sobre diversas acciones neurotóxicas de los piretroides en insectos y en vertebrados incluyendo también los mamíferos. Dado el amplio uso de los insecticidas piretroides, la toxicidad de los piretroides ha sido y sigue siendo objeto de estudio en diferentes especies de vertebrados e invertebrados. Los piretroides en un principio fueron catalogados como compuestos seguros para el hombre, no obstante, desde mediados de los años 70 y cada vez con mayor rigurosidad se viene realizando la evaluación del riesgo toxicológico. No obstante la ventaja principal frente a otros insecticidas es la toxicidad selectiva debido a su metabolismo, siendo mucho más tóxicos para insectos que para los mamíferos. Por ejemplo, el piretroide deltametrin presenta un valor de la dosis letal 50 (DL_{50}) cutánea de 0,01 mg/kg p.c. en mosca y una DL_{50} oral en rata de 135 mg/kg p.c. (LITCHFIELD, 1985). Es claro que esta elevada toxicidad selectiva puede deberse a su efecto dependiente de la temperatura, son más tóxicos a bajas temperaturas, y a la distinta disposición y actividad de las enzimas P450 metabolizantes presentes en insectos y en mamíferos implicadas en el metabolismo y detoxicación de los piretroides.

Toxicidad aguda

Uno de los factores determinantes de la toxicidad aguda de los piretroides obviamente es la vía de administración. Los piretroides son más tóxicos cuando se administran por vía intravenosa o intraperitoneal que cuando se administran por vía oral (VERSCOYLE y ALDRIGE, 1980; GRAY y SODERLUND, 1985) dependiendo ésta última del vehículo utilizado.

Un factor determinante de la toxicidad es su estructura química, los piretroides Tipo II son más tóxicos que los Tipo I, y en ciertos piretroides la isomería *cis/trans*, principalmente en los piretroides Tipo I no α -ciano, siendo en general los isómeros *cis* más tóxicos que los *trans* en mamíferos. Un ejemplo lo tenemos en el permetrin (80% *cis*: 20% *trans*), el cual tiene una DL₅₀ oral en rata de 224 mg/kg p.c., mientras que el mismo piretroide (20% *cis*: 80% *trans*) tiene una DL₅₀ de 6000 mg/kg p.c.; esto mismo se ha observado en otros piretroides no α -ciano como el cipermetrin y el resmetrin (MIYAMOTO, 1976; CASIDA *et al.*, 1983; GRAY y SODERLUND, 1985; LITCHFIELD, 1985). La isomería óptica también influye en la toxicidad.

La mayoría de los piretroides Tipo I ó no α -ciano tienen una toxicidad aguda generalmente inferior a la de los piretroides Tipo II ó α -ciano. No obstante, algunos de los nuevos compuestos no α -ciano son hasta 50 veces más tóxicos que sus predecesores, como por ejemplo el fenflutrin piretroide Tipo I, con un valor de DL₅₀ oral en rata de 85-120 mg/kg p.c. (LARSON *et al.*, 1985). La Tabla 3 muestra los valores de DL₅₀ en rata por vía oral de distintos piretroides administradas en aceite de maíz. (WHO, 1996).

En mamíferos, las respuestas bioquímicas y fisiológicas a la intoxicación por piretroides han sido revisadas ampliamente por CASIDA *et al.* (1983), GRAY y SODERLUND (1985) y NRCC (1986). En general, la intoxicación aguda en ratas produce alteraciones en los parámetros bioquímicos sanguíneos (aumento de la glucosa y de lactato en sangre, aumento de los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina, disminución del pH arterial y aumento del consumo de oxígeno) y cardio-respiratorios, frecuentemente coincidentes con un aumento en la actividad muscular durante las convulsiones.

Tabla 3. Toxicidad oral aguda de piretroides (DL₅₀ en rata) (WHO, 1996)

Piretroide		DL ₅₀ oral (mg/kg p.c.)
Tipo I (no α -ciano)	Aletrin	685
	Bifentrin	55
	Bioaletrin	700
	Fenflutrin	85-120
	Fenotrin	>5000
	Permetrin	500
	Resmetrin	2000
	Tetrametrin	>5000
Tipo II (α -ciano)	Cifenotrin	318
	Ciflutrin	250
	β -ciflutrin	450
	Cialotrin	144
	lambda-cialotrin	56
	Cipermetrin	250
	Deltametrin	135
	Fenpropatrin	66
	Fenvalerato	450

Los piretroides, principalmente los piretroides Tipo II ó α -ciano, inducen efectos cardiovasculares en mamíferos dependientes de la dosis y de la vía de administración. Entre los efectos, se ha descrito un aumento de la presión arterial, probablemente mediado por un incremento en la liberación de catecolaminas periféricas, y un efecto inotrópico positivo directo (CHANH *et al.*, 1980; BRADBURY *et al.*, 1983; FORSHAW y BRADBURY, 1983).

También se han descrito numerosos cambios neuroquímicos (elevada utilización de la glucosa en cerebro, incremento en los niveles de GMPc en cerebelo, y disminución de la acetilcolina en cerebro) asociados con una actividad neuronal-cerebral elevada, que reflejan una respuesta a la acción tóxica de los piretroides (GRAY y SODERLUND, 1985).

Aunque se ha observado que los piretroides causan neurotoxicidad en ensayos de toxicidad aguda, a dosis bajas no se producen cambios histopatológicos en las membranas nerviosas de mamíferos. Sin embargo, en ensayos de toxicidad subaguda, subcrónica y crónica a dosis elevadas (cercanas a la DL_{50}), los piretroides provocan degeneración axonal reversible, principalmente en el sistema nervioso periférico, aunque también esto se ha descrito ocasionalmente en la médula espinal y en el cerebro. La alteración observada con mayor frecuencia a nivel periférico es la destrucción de la vaina de mielina del nervio ciático (FAO, 1980; ALDRIDGE, 1990; VIJVERBERG y VAN DEN BERCKEN, 1990). En un estudio de toxicidad subaguda (10 días) realizado en ratas a las que se administró fenvalerato a dosis de 3000 mg/kg p.c., se observó una destrucción de los axones del nervio ciático, que se mantuvo tres semanas durante el periodo de recuperación y que no se observó en un examen realizado seis semanas después de la suspensión del tratamiento (FAO, 1980).

Las especies animales más utilizadas para la determinación de la DL_{50} por vía cutánea son el conejo y la rata. La Tabla 4 presenta los valores de DL_{50} obtenidas por esta vía de administración (BRADBURY y COATS, 1989).

Tabla 4. Toxicidad aguda dérmica de piretroides en rata (BRADBURY Y COATS, 1989).

Piretroide		DL ₅₀ cutánea (mg/kg p.c.)
Tipo I (no α -ciano)	Aletrin	>2500
	Bifentrin	>2000 (conejo)
	Bioaletrin	>2660
	Fenotrin	>2000
	Permetrin	>4000
	Resmetrin	>3000
	Tetrametrin	>5000
Tipo II (α -ciano)	Cifenotrin	>5000
	Ciflutrin	>5000
	β -ciflutrin	>5000
	Cialotrin	>200
	λ -cialotrin	1293-1507
	Cipermetrin	>4920
	Deltametrin	>2000 (conejo)
	Fenpropatrin	>870
	Fenvalerato	1000-3200

CARPENTER *et al.* (1950) describieron los primeros estudios para el cálculo de la toxicidad aguda por inhalación de los piretroides. Los valores de la concentración letal 50 (CL₅₀) varían entre los distintos piretroides. MIYAMOTO (1976) determinó la CL₅₀ para el aletrin, fenotrin, furametrin, resmetrin, permetrin y tetrametrin en periodos de exposición de dos, tres o cuatro horas. Los valores de CL₅₀ estaban en un intervalo de 686 mg/m³ de aire inhalado, para el permetrin, hasta 2500 mg/m³ para el tetrametrin en ratas y ratones (Tabla 5). En un ensayo de toxicidad por inhalación realizado en ratas

y ratones con fenvalerato en aerosol en suspensión acuosa, con un periodo de exposición de tres horas, se determinó una CL₅₀ superior a 101 mg/m³ (FAO, 1980). La CL₅₀ determinada para el deltametrin, en un estudio en ratas expuestas durante 2 - 2,5 h al piretroide en forma de aerosol en solución en dimetilsulfóxido (DMSO), fue de 940 mg/m³ y 785 mg/m³, para machos y hembras respectivamente (KAVLOCK *et al.*, 1979).

Tabla 5. Toxicidad inhalatoria aguda de piretroides (MIYAMOTO (1976).

Piretroide	Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ (mg/m ³)	
		Rata	Raton
Aletrin	2	>2000	>2000
Fenotrin	4	>1200	>1200
Furametrin	2	>2000	>2000
Permetrin	3	>685	>685
Resmetrin	4	>1500	>1500
Tetrametrin	3	>2500	>2500

Toxicidad crónica

En estudios de toxicidad subcrónica y crónica en mamíferos, los piretroides provocan, a dosis elevadas, signos reversibles de toxicidad. En el estudio de toxicidad de la reproducción y desarrollo, a dosis elevadas, también se observa un retraso en el crecimiento que puede ser un efecto tóxico directo o bien provocado como consecuencia de la inapetencia o la disminución de ingesta de alimentos causada por la administración de estos insecticidas. En general, no se observan cambios significativos en los parámetros hematológicos ni en los bioquímicos. El examen histopatológico de los órganos de los animales sometidos a ensayo sólo demuestra alteraciones de importancia en el hígado, aunque no con todos los piretroides estudiados (LITCHFIELD, 1985).

Se ha evaluado el potencial mutagénico de algunos piretroides utilizando el test de Ames en *Salmonella typhimurium*, entre otros. Los resultados obtenidos demuestran que los piretroides resmetrin, permetrin, y fenvalerato no son mutágenos (RUZO y CASIDA, 1977; BARTSCH *et al.*, 1980; PLUIJMEN *et al.*, 1984). Otros estudios de mutagenesis *in vitro* también corroboran que los piretroides no son mutagenos. Estudios *in vitro* con cinco piretroides (fenvalerato, deltametrin, cipermetrin, permetrin y ciflutrin) en células V79 de pulmón de hámster, dirigidos a evaluar la capacidad de inducción de la división mitótica, no demostraron efectos citotóxicos (HADNAGY *et al.*, 1999). Otros resultados presentados por HERRERA y LABORDA (1988) contradicen a los anteriores, ya que estos investigadores describen que aletrin, en ensayos con activación metabólica, provocan mutaciones probablemente por sustitución de pares de bases. Otros autores han descrito en estudios *in vitro* que el permetrin causa efectos citogenéticos en presencia de activación metabólica en cultivos de linfocitos humanos y en células CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) (BARRUECO *et al.*, 1992; 1994). También se ha descrito un efecto inductor de aberraciones cromosómicas del fenvalerato (PATI y BHUNYA, 1989; PUIG *et al.*, 1989; CABALLO *et al.*, 1992). Sin embargo, la mutagenicidad estudiada *in vitro* sobre mutaciones en genes de bacteria así como en cultivos celulares de mamíferos ha dado resultados negativos con respecto a un posible daño en el ADN. Por otra parte, estudios *in vivo* en ratones mostraron en médula ósea (ERIKSSON y FREDRIKSSON, 1991; EL-GOHARY *et al.*, 1999) la formación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y morfología anormal de los espermatozoides. Sin embargo, en otros estudios en ratones no se observó la formación de micronúcleos ni aberraciones cromosómicas en médula ósea. La evaluación del piretroide deltametrin en estudios *in vitro* e *in vivo* tampoco conllevó a clasificar la piretroide deltametrin como un compuesto mutágeno o clastogénico (TUCKER, 1994;

DESCOTES, 2000; GUPTA, 2012). Además, en estudios de carcinogénesis se ha observado que el permetrin en ratones, a dosis elevadas, provoca un incremento del número de tumores benignos localizados en el hígado y en pulmón, no observándose efectos oncogénicos en ratas (BRADBURY y COATS, 1989). Por el momento no existe evidencia para adjudicar un potencial mutágeno ni cancerígeno para los piretroides.

En un estudio de reproducción y desarrollo en ratas, en tres generaciones y dos camadas por generación, deltametrin se administró a dosis de 0,2; 20 y 50 ppm (equivalente a 0,024; 2,4 y 6 mg/kg p.c. /día, respectivamente) en la dieta. Los únicos efectos observados fueron en el grupo de la más alta dosis, equivalente a 6 mg/kg p.c. /día. Los efectos observados fueron la reducción de la ganancia de peso corporal en las hembras de la primera generación a la dosis máxima, reducción del consumo de alimentos en los machos de la segunda generación a la dosis más alta y reducción ligera del peso de las crías al destete en el grupo de 6 mg/kg p.c. /día (IPCS, 1990; TUCKER, 1994). En este estudio se determinó un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) de 2,4 mg/kg p.c. /día. Otros estudios de toxicidad de la reproducción y del desarrollo en ratones, ratas y conejos tras la administración de deltametrin por vía oral por gavage (IPCS, 1990; ZHANG *et al.*, 1991; MESTRES y MESTRES; 1992; JANA-KARA *et al.*, 1995; LINES, 1996; POONAM *et al.*, 2013) muestran que en ratones a los que se les administraron dosis de 0,1; 1 y 10 mg/kg p.c./día de deltametrin en aceite de sésamo desde los días 6 al 17 de preñez y se sacrificaron al día 18 de la preñez, se observaron reducciones mínimas en el peso fetal y osificación retardada a todas las dosis. Otro estudio en el mismo tipo de ratones, utilizando las mismas dosis, vehículo y período de dosificación, se observó un retraso en el desarrollo fetal a las dosis de 1 y 10 mg/kg p.c. /día (EL-GOHARY *et al.*, 1999). Los piretroides no están considerados como teratógenos o tóxicos selectivos embrio-fetales.

Toxicidad para el hombre

En humanos, principalmente tras exposición laboral se han descrito una amplia variedad de síntomas reversibles, entre los que se encuentran principalmente parestesia facial con sensación de quemazón, entumecimiento y picazón, así como irritación de las mucosas y del tracto respiratorio (HE *et al.*, 1988, 1989). La parestesia facial, provocada fundamentalmente por los piretroides α -ciano (PAULUHN, 1996), no va acompañada de manifestaciones clínicas como eritema, edema o formación de vesículas (LEQUESNE *et al.*, 1980; KNOX *et al.*, 1984). La sensación cutánea de prurito y entumecimiento, probablemente producida por casi todos los piretroides, es un síntoma clínico específico sin signos de irritación, con un ligero tiempo asintomático en su inicio y con una lenta pero completa recuperación que generalmente ocurre en un día (Tabla 6). La relación estructura-actividad de este efecto parece ser similar al de otros signos de toxicidad siendo más tóxicos los piretroides Tipo II que los de Tipo I. En general se admite que este efecto local no es debido a una circulación sistémica del compuesto sino que se origina cuando la piel se expone en contacto con estos insecticidas (ALDRIDGE, 1990).

Otros síntomas inespecíficos observados en trabajadores expuestos incluyen dolor de cabeza, sudoración, vértigo, náuseas, dolor epigástrico y fatiga (HE *et al.*, 1988; 1989). En algunos casos se ha descrito hipersensibilidad del tracto respiratorio (WAX *et al.*, 1994; LESSENGER, 1992). Tras la exposición a dosis elevadas se han descrito cuadros de fasciculación muscular, calambres, inconsciencia, coma y parálisis respiratoria, así como aumento del ritmo cardíaco y edema pulmonar (HE *et al.*, 1989; WAX *et al.*, 1994). No se han descrito efectos crónicos; no obstante, aunque tras la exposición no se observan efectos neurológicos reseñables (LEQUESNE *et al.*, 1980),

podría producirse neuropatía (VIJVERBERG Y VAN DEN BERCKEN, 1990; MARONI Y FAIT, 1993).

Tabla 6. Persistencia de síntomas cutáneos (prurito y entumecimiento) tras la exposición dérmica a piretroides

Piretroide	Tiempo de recuperación tras la exposición	Referencia
Cipermetrin	30 minutos-8 horas	Lequesne <i>et al.</i> (1980)
Fenvalerato	30 minutos-8 horas	Lequesne <i>et al.</i> (1980)
Fenpropatrin	30 minutos-8 horas	Lequesne <i>et al.</i> (1980)
Fenvalerato	Toda la noche	Kolmodin-Hedman <i>et al.</i> (1995)
Fenvalerato	24 horas	Tucker <i>et al.</i> (1984)
Flucitrinato	28-32 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Cipermetrin	28-32 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Fenvalerato	28-32 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Permetrin	14 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Fenvalerato	24-28 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Permetrin	24-28 horas	Flannigan y Tucker (1985)
Fenvalerato	24 horas	Knox <i>et al.</i> (1984)
Flucitrinato	3 días	Flannigan y Tucker (1985)
Deltametrin	2 días	FAO (1980)
Fluvalinato	8-12 horas	SANDOZ (1987)
Ciflutrin	Varias horas	BAYER (1987)
Alfametrin	Varias horas	SHELL (1983)
Cipermetrin	Transitorio	SHELL (1983)

Se han publicado estudios epidemiológicos de la población expuesta a piretroides, fundamentalmente en trabajadores que manipulan y aplican los mismos (HE *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 1991; KOLMODIN-HEDMAN *et al.*,

1995; SATPATHY *et al.*, 1997; WIESELER *et al.*, 1998). En estabulaciones la exposición se produce principalmente en las fases de manipulación, mezcla y aplicación de estos insecticidas. La mayoría de los operarios sometidos a estudio presentaban parestesia facial, vértigos, dolor de cabeza, fatiga, náuseas y pérdida de apetito. Sólo una minoría desarrolló síntomas sistémicos con fasciculación muscular y aturdimiento (CHEN *et al.*, 1991). En los estudios epidemiológicos publicados no se ha encontrado una correlación entre los síntomas, las manifestaciones clínicas y la monitorización de piretroides y sus metabolitos en sangre y orina (HE *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 1991; KOLMODIN-HEDMAN *et al.*, 1995; WIESELER *et al.*, 1998) aunque existen muy pocos estudios en esta línea.

El tratamiento de la intoxicación por piretroides comienza por alejar al afectado de la fuente de exposición. Otras medidas incluyen la administración de antiinflamatorios esteroideos por vía tópica o sistémica, dependiendo de la gravedad de la dermatitis alérgica de contacto, y la utilización de aerosoles de aplicación nasal con antihistamínicos, descongestivos y antiinflamatorios esteroideos para la rinitis alérgica, todo ello asociado con antagonistas β_2 y esteroides por inhalación, en el caso de que se produzca asma. La parestesia cutánea puede ser tratada con vitamina E como agente profiláctico y terapéutico, que actúa bloqueando los canales de Na^+ de las terminaciones nerviosas de la piel, provocando estabilización de la membrana (TUCKER *et al.*, 1984; FLANNIGAN y TUCKER, 1985; SONG y NARAHASHI, 1995; O'MALLEY, 1997). Además de la vitamina E, las cremas con vitamina A y D y el anestésico local benzocaína, son efectivas en la prevención de la parestesia; sin embargo, difenhidramina, indometacina y óxido de zinc en pomada no muestran eficacia (MIYAMOTO *et al.*, 1995). También se utilizan relajantes musculares como la mefenesina y el metocarbamol (BRADBURY *et al.*, 1981; HIROMORI *et al.*, 1986),

mientras que la atropina se utilizó en casos de hipersalivación provocada por los piretroides (RAY Y CREMER, 1979).

3.2.5. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS

El amplio espectro de acción insecticida de los piretroides los hace útiles para el control de una amplia variedad de artrópodos. Son sensibles a los piretroides la mayoría de las especies causantes de plagas o infestaciones de importancia económica tales como escarabajos, moscas, mosquitos, chinches, garrapatas y piojos (BRADBURY y COATS, 1989). Además de su eficacia por contacto e ingestión frente a insectos, los piretroides también muestran un efecto repelente que incluye el cese en la alimentación, hiperactividad y fatiga (RICE *et al.*, 1983; HERVÉ, 1985). La Tabla 7 recoge el tiempo de duración del efecto inmovilizante de piretroides Tipo II (ciflutrin y deltametrin) y Tipo I (permetrin) sobre algunas especies de insectos.

Tabla 7. Tiempo de inmovilización en distintas especies de insectos inducido por piretroides.

Especie	Dosis (mg/m ²)	Tiempo de inmovilización		
		Ciflutrin	Deltametrin	Permetrin
<i>Musca domestica</i>	1,128	90 min	120 min	-
<i>Aedes aegypti</i>	1,128	210 min	120 min	6 h = 0%
<i>Anopheles stephensi</i>	1,128	180 min	150 min	6 h = 0%
<i>Xenopsylla cheopis</i>	5,64	72 h	72 h	72 h = 80%
<i>Blattella germanica</i>	1,128	72 h	72 h = 90%	72 h = 0%
<i>Blatta orientalis</i>	141	105 min	60 min	360 min
<i>Periplaneta americana</i>	5,64	150 min	105 min	72 h = 40%

Los insecticidas piretroides se han utilizado durante más de 20 años para controlar plagas de insectos en una amplia variedad de cultivos (MAUND *et al.*, 2002),

hoy en día son de amplio uso por las prohibiciones y restricciones del uso de los insecticidas inhibidores de la colinesterasa (LUO y ZHANG, 2011). En los años 2000 y 2001, la Environmental Protection Agency (EPA) restringió el uso residencial de los plaguicidas organofosforados, clorpirifos y diazinon (USEPA, 2000; USEPA, 2001), lo que originó un aumento significativo del uso de los piretroides. Los piretroides tienen una alta participación en el mercado de los insecticidas debido a su gran poder insecticida, biodegradabilidad, amplio espectro, y relativa baja toxicidad en mamíferos (PAP *et al.*, 1996). Debido a que los insecticidas piretroides son considerados como alternativas más seguras que otros plaguicidas, se vienen usando a nivel mundial ampliamente para el control de plagas (AMWEG *et al.*, 2006). Por ejemplo, de acuerdo con los datos de la EPA, mas de 1 millón de kg de permetrin se vienen utilizando anualmente en agricultura, a nivel residencial y en medicina humana y veterinaria (FEO *et al.*, 2010). De este total, más de 630.000 kg se aplican anualmente en entornos no agrícolas, siendo el 41% de su uso en áreas residenciales (USEPA, 2006; MOORE *et al.*, 2009). Actualmente, los piretroides son utilizados para desinsectación tanto dentro como fuera de los hogares, en medicina humana y veterinaria, en agricultura, silvicultura, horticultura y en salud pública (FEO *et al.*, 2010).

Algunas especies de insectos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia frente a los piretroides. BUSVINE (1951) describió la resistencia cruzada a piretroides en moscas resistentes a la inmovilización por DDT. Posteriormente, se descubrió que este tipo de resistencia cruzada, conocida como “resistencia a la inmovilización” o “resistencia *kdr*” (knock down resistance), era provocada por un gen homocigótico y recesivo, denominado gen *kdr*, ligado a la insensibilidad nerviosa (FARNHAM, 1977). Esta selectividad genética, confiere a los insectos resistencia tanto

a insecticidas organoclorados tipo DDT como a los insecticidas piretroides, por este motivo se utilizan los piretroides en combinación con otros insecticidas.

Los piretroides juegan un papel importante entre los insecticidas que actúan frente a insectos como vectores de enfermedades endémicas de gran importancia en salud pública. Actualmente el metoflutrín, piretroide de reciente introducción, reduce la actividad del mosquito *Aedes aegypti* a través de la confusión, el efecto “knockdown” y la posterior muerte del mosquito, el cual es el vector del virus Zika. Además de su uso en zonas tropicales es necesario desarrollar estrategias para su uso en lugares donde se encuentren personas de alto riesgo (mujeres embarazadas) (BUHAGIAR *et al.*, 2017). Los piretroides también se utilizan principalmente frente a los mosquitos hembra del género *Anopheles*, vectores de la malaria, originada por el *Plasmodium* spp. También se utilizan frente a hematófagos (*Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*) vectores del parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (KIRCHHOFF, 1998). Asimismo, los piretroides se utilizan como insecticidas frente a la mosca tsetse, insecto hematófago del género *Glossina*, que es transmisora de la enfermedad del sueño causada por los parásitos protozoarios flagelados de la especie *Trypanosoma brucei* (subespecies *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*) (HERVÉ, 1985; KIRCHHOFF, 1998).

La utilización de los piretroides en medicina veterinaria se debe fundamentalmente a su acción frente a moscas, tábanos y garrapatas. Además, también se utilizan como agentes antiparasitarios externos para el tratamiento de parasitosis en los animales domésticos (GUÍA DE PRODUCTOS ZOOSANITARIOS, 1997; ANADÓN *et al.*, 2009; ANADÓN *et al.*, 2013a) (Tabla 8). Los piretroides también se emplean como insecticidas de uso fitosanitario en prácticamente casi todo tipo de cultivos, como el algodón, árboles frutales, vid, cereales, café, tabaco, cítricos y plantas

ornamentales. También se utilizan como insecticidas en zonas de almacenamiento de alimentos, principalmente de cereales (HERVÉ, 1985).

Tabla 8. Insecticidas piretroides usados en medicina veterinaria (ANADÓN *et al.*, 2013a)

Piretroide	Vía de administración	Especie animal	Indicaciones	Dosis
α -Cipermetrin	Tópica	Bovino, ovino	Ectoparásitos (garrapatas, pulgas, piojos, moscas)	150 mg/animal
		Aves de corral	Ectoparásitos	8-10 mg/animal
Ciflutrin	Tópica	Bovino, caprino	Ectoparásitos (pulgas y moscas)	100 mg/animal
Cialotrin	Tópica	Bovino, cerdos y ovejas	Ectoparásitos (moscas)	0,2 mg/p.c. vacas 0,1 mg/p.c. ovejas y cerdos
				Spray (hasta 250 mg/animal)
				Baño(50g/100 L de agua)
Cipermetrin	Tópica	Vacunos, vacunos en lactación, ovejas, cabras, cerdos, pollos, ovejas y cabras	Ectoparásitos (garrapatas, pulgas, piojos, moscas)	
	Baño	Salmónidos	Piojo de mar	5 mg / L de agua de mar durante un período de 1 h
Deltametrin	Tópica	Vacas, ovejas y pollos	Ectoparásitos (moscas)	0,25-1,5 mg/kg p.c. vacas
				0,94-4,5 mg/kg p.c. ovejas
				0,08 mg/kg p.c. pollos
	Baño	Peces (salmón atlántico)	Piojo de mar	2-3 mg /L de agua durante 30-40 min
Flumetrin	Tópica	Bovino, ovino	Garrapatas, piojos, ácaros y sarna	2 mg/kg p.c. o baño 1L/900L de agua
Permetrin	Tópica	Vacunos, cerdos, ovejas, cabras y pollos	Ectoparásitos (pulgas, ácaros, garrapatas y piojos)	4 mg/kg p.c. vacas, 6 mg/kg p.c. cerdos, ovejas y pollos

En medicina humana, los ectoparasiticidas se emplean en el tratamiento de infecciones parasitarias de la piel producidas por artrópodos. Las principales infecciones parasitarias de la piel son la escabiosis y la pediculosis. La escabiosis (sarna) es una infección parasitaria de la piel causada por el acaro *Sarcoptes scabiei*, y la pediculosis es una infestación por piojos (causada por *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus corporis* y *Phthirus pubis*). Los piretroides se emplean principalmente en la pediculosis en formulaciones de uso externo (0,5-1%) como champú, crema, loción o aerosol, solos o en combinación con otros insecticidas o acaricidas o con compuestos sinérgicos (butóxido de piperonilo). Los piretroides más usados son aletrin, bioaletrin, d-fenotrin, tetrametrin y permetrin. Permetrin es el piretroide que más se utiliza en la pediculosis de la cabeza (champú al 1-1,5 %). Permetrin también se utiliza en la escabiosis en forma de crema al 5 % aplicada en toda la superficie corporal afectada; la crema ha de permanecer en contacto con la piel durante un mínimo de 12 h y preferiblemente por más tiempo (24 h). Una vez el tratamiento, preferiblemente durante la noche, se debe lavar toda la superficie corporal afectada con agua y jabón. Se debe repetir el tratamiento al cabo de 2 semanas si hay ácaros vivos. En el uso de permetrin hay que tomar precaución para evitar el contacto con la cara y los ojos, mucosas y zonas sensibles de la piel. Permetrin puede utilizarse en el embarazo, en la lactancia y en niños pequeños (ANADÓN *et al.*, 2017).

Los piretroides sintéticos también son considerados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) por su uso insecticida en aviones para el control de vectores (RAYMAN, 2006). La WHO también recomienda ciertos piretroides (bifentrin, ciflutrin, deltametrin, lambda-cialotrin) para la fumigación de ambientes cerrados para el control de vectores (mosquitos del género *Anopheles*) del paludismo (WALKER, 2000; RAGHAVENDRA *et al.*, 2011). Además, la WHO recomienda aplicar los

piretroides sobre los mosquiteros como estrategia fundamental frente a los vectores de la malaria (WHO, 2005; RAGHAVENDRA *et al.*, 2011). Los piretroides se usan para el control de plagas y la erradicación de vectores implicados en enfermedades tropicales (CHEN *et al.*, 2011).

3.3. CIFLUTRIN

Ciflutrin, piretroide Tipo II ó α -ciano, (3-[2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetil-ciclopropano acido carbónico-(ciano-4(-fluoro-3-fenoxifenil) metil]-ester) contiene tres centros quirales y por lo tanto existe en ocho formas enantioméricas, dando cuatro pares de diastereoisómeros (Figura 4).

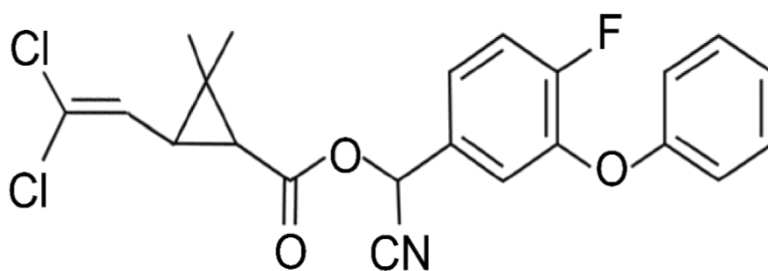


Figura 4. Estructura química del piretroide ciflutrin

El piretroide Tipo II o α -ciano ciflutrin fue sintetizado por la compañía Bayer AG en 1976 bajo la denominación FCR 1272 en los laboratorios de investigación de la División de Agroquímicos situados en Wuppertal - Eldberfeld (Alemania) (HAMMAN y FUCHS, 1981). Ciflutrin proporciona un excelente control sobre la mayoría de las plagas que afectan a los cultivos. La ventaja de este piretroide sobre otros insecticidas convencionales es su eficacia a dosis extremadamente bajas. Tiene un efecto de inmovilización muy rápido, combinado con una prolongada acción residual (HAMMAN y FUCHS, 1981). Desde su síntesis se han desarrollado un gran número de

formulaciones que contienen ciflutrin sólo o en combinación con otros ingredientes activos técnicos como el propoxur, diclorvos y fenflutrin, con múltiples posibilidades de aplicación (BEHRENZ *et al.*, 1983).

El número de identificación de ciflutrin en el *Chemical Abstracts Service* (CAS) es 68359-37-5. Es conocido por distintos sinónimos: Baythroid, cifoxilato, Bay FCR 1272, FCR-1272 y BAY VL 1704.

Ciflutrin puede sintetizarse por distintos métodos. La vía de síntesis directa consiste en la esterificación del alcohol 2-fenoxi-4-fluoro- α -(*RS*)-ciano bencílico con el cloruro del ácido (1*RS*)-*cis trans* permetrínico (HAMMAN y FUCHS, 1981).

Ciflutrin es un producto de consistencia pastosa-oleosa y color marrón amarillento, que torna a un aceite más claro cuando se encuentra a temperaturas superiores a los 60 °C. La densidad es de 1,34 g/cm³ a 22 °C y 1,27 g/cm³ a 20 °C, y su punto de inflamación es de 107 °C (LIDE y MILNE, 1994; O'NEIL, 2001).

La Organización Mundial de la Salud ha establecido las especificaciones de pureza y los métodos para la determinación de las propiedades físicas y químicas del ingrediente activo, del polvo humectable y de la emulsión oleo-acuosa de ciflutrin utilizada como plaguicida en salud pública (WHO, 1998).

El piretroide Tipo II o α -ciano ciflutrin es usado ampliamente contra una variedad de insectos en medicina humana, medicina veterinaria y agricultura, en especial contra los géneros Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera y Diptera (HAMMAN Y FUCHS, 1981). El uso de ciflutrin en salud pública es de gran importancia por ejemplo en enfermedades como la leishmaniasis, donde se controla y erradica la población de su principal vector el *Phlebotomus papatasi*. Ciflutrin a dosis de 0,15 % disuelta en agua en áreas endémicas causa reducción y erradicación de dichos vectores (SHIRANI-BIDABADI *et al.*, 2017). Otros vectores de gran importancia como el *Aedes*

aegypti, portadores el virus de la fiebre amarilla y el dengue, son susceptibles a ciflutrin, sin embargo en los últimos años se han visto resistencias en estos vectores (SEIXAS *et al.*, 2017). Así mismo, el *Anopheles sinensis* (mayor vector de la malaria) también viene mostrando resistencia insecticida, sin embargo muestra susceptibilidad a ciflutrin a 0,15 % (DAI *et al.*, 2015).

Ciflutrin es un insecticida usado en explotaciones avícolas donde se observa que este piretroide tiene una alta eficacia insecticida frente a la mosca doméstica tanto en las larvas como en adultos (ONG *et al.*, 2015).

En la industria pecuaria el uso del piretroide ciflutrin es muy común en las explotaciones de ganado vacuno, donde se suele usar sólo o en mezclas insecticidas en especial contra garrapatas del género. *Amblyomma variegatum* y *A. hebraeum*. Así mismo, las mezclas de ciflutrin con feromonas han mostrado buenos resultados en el control de garrapatas en bovinos (NORVAL *et al.* 1996).

El uso doméstico de ciflutrin también es aplicado por pulverización sobre grietas, ventanas, puertas y techo. Su uso abarca la desinsectación de moscas, escarabajos de la basura, ácaros rojos, cucarachas, hormigas y termitas. Ciflutrin es más eficaz contra las cucarachas, las hormigas y las termitas (ECHA, 2016).

3.3.1. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN

Con respecto al ciflutrin, piretroide seleccionado en la presente investigación no se han descrito estudios toxicocinéticos. Los estudios descritos en este campo han sido dirigidos principalmente a estudios de biotransformación. La Figura 5 esquematiza las diferentes fases de las vías metabólicas propuestas para ciflutrin en mamíferos.

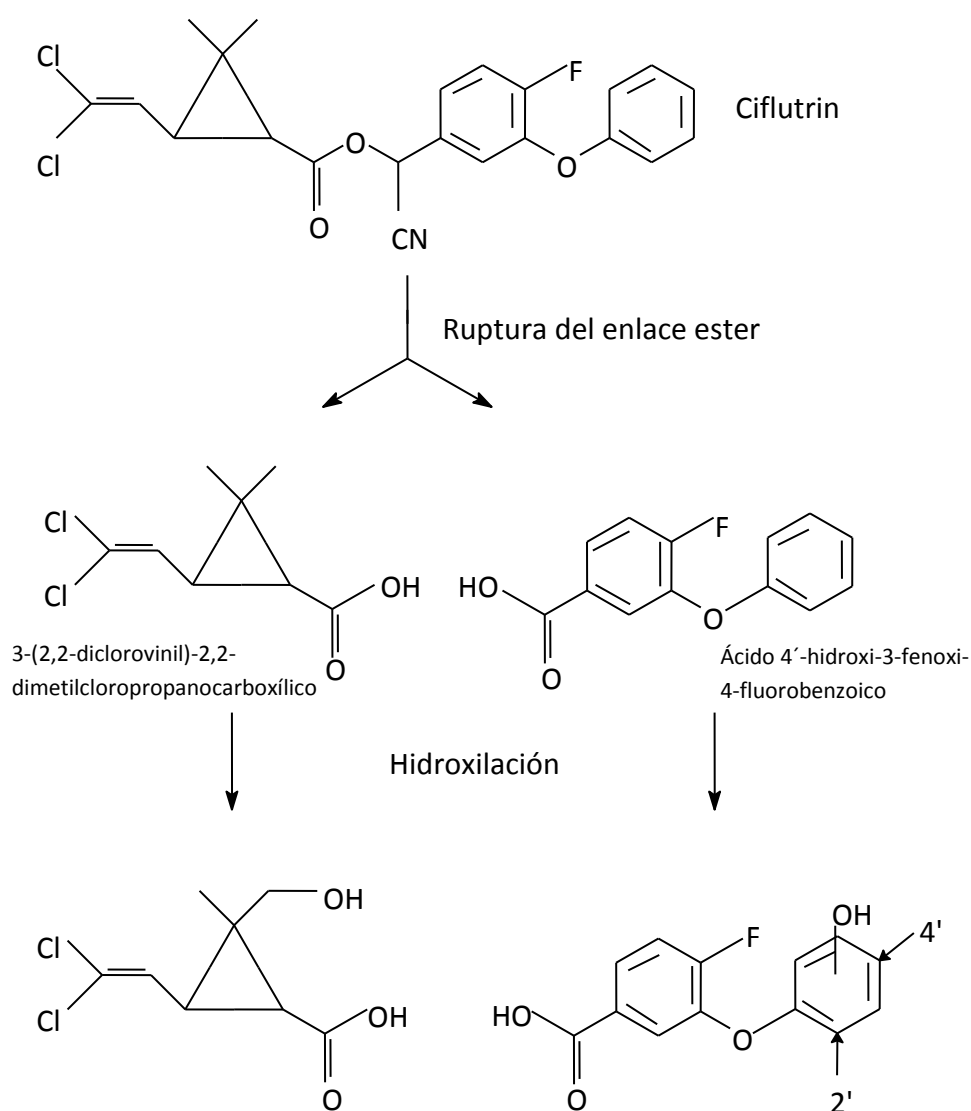


Figura 5. Principales vías del metabolismo del piretroide ciflutrin en mamíferos

ECKER (1982) describe un estudio de metabolismo en ratas tras la administración de una dosis oral única de 10 mg/kg p.c. de ciflutrin radiomarcada con ^{14}C . Más del 65 % de la radioactividad se excretó en orina dentro de las primeras 24 h tras el tratamiento. Los metabolitos identificados en la orina 8 h después de la

administración fueron, principalmente, los conjugados del ácido 4'-hidroxi-4-fluoro-3-fenoxibenzoico (33 %) y del ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (27 %).

Principalmente se conoce que en especies de animales (rata, vaca, gallina), en plantas (trigo, patata, soja, algodón y tomate), en suelo y en condiciones abióticas, la ruptura del enlace éster, mediante la intervención de esterasas, es la primera etapa de la ruta metabólica o de degradación de ciflutrin. En esta primera etapa se forman los ácidos *cis*- y *trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano carboxílico y la correspondiente cianhidrina bencílica que, debido a su inestabilidad, se descompone formando el 4-fluoro-3-fenoxibenzaldehído, que posteriormente por medio de oxidasas se transforma en alcohol 4-fluoro-3-fenoxibencílico, ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (FPB-ácido), ácido 4'-hidroxi-4-fluoro-3-fenoxibenzoico y 1-fluoro-2-fenoxibenceno. Los ácidos se conjugan parcialmente y se eliminan por vía renal (FAO, 1986; KÜHN *et al.*, 1996).

3.3.2. TOXICIDAD DE CIFLUTRIN

Los valores de DL₅₀ de toxicidad aguda por vía oral para el ciflutrin en ratas hacen que este piretroide se clasifique como *compuesto muy tóxico por ingestión*, de acuerdo a la Directiva 67/548/CEE, sobre clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Los valores de DL₅₀ oral de ciflutrin en ratas se presentan en la Tabla 9 (HAMMAN Y FUCHS, 1981; BEHRENZ *et al.*, 1983; FAO, 1987).

Tabla 9. Toxicidad aguda de ciflutrin tras administración oral (HAMMAN Y FUCHS, 1981; BEHRENTZ *et al.*, 1983; FAO, 1987).

Especie/sexo	DL ₅₀ (mg/kg p.c.)	Vehículo
Rata/macho	500 - 800	Lutrol ⁽¹⁾
Rata/hembra	1200	Lutrol ⁽¹⁾
Rata/macho	12 - 25	Cremophor ⁽²⁾ + H ₂ O
Rata/macho	250	Aceite
Rata/macho	400	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Rata/macho	500	Isododecano
Rata/macho	500	Xileno
Rata/macho	>500	N-metilpirrolidona

⁽¹⁾ El lutrol es un copolímero de polioxietileno y polioxipropileno utilizado principalmente en la industria farmacéutica como agente emulsificante y solubilizante (Collett y Weller, 1994).

⁽²⁾ El Cremophor[®] es un emulgente no iónico, derivado polioxietilénico del aceite de ricino, que se utiliza en formulaciones orales, tópicas y parenterales (Yu, 1994).

La toxicidad dérmica de ciflutrin es muy baja, con un valor de DL₅₀ en ratas superior a 5000 mg/kg p.c., tras una exposición de 24 horas. El valor de DL₅₀ en ratas tras administración intraperitoneal de ciflutrin disuelta en polietilenglicol es de 66 mg/kg p.c. para ratas machos y 104 mg/kg p.c. para ratas hembras; la DL₅₀ tras administración subcutánea en ratón es superior a 2500 mg/kg p.c. (EMEA, 1997).

En lo que respecta a la vía por inhalación, ciflutrin está clasificado *como tóxico por inhalación*, de acuerdo con lo establecido en la Directiva 67/548/CEE.

En un estudio de toxicidad aguda por inhalación, se sometió a ratas y ratones a una exposición durante una hora de ciflutrin en un nebulizado, vehículo compuesto por una mezcla de PEG 400 y etanol (50:50 v/v). En este estudio se observó que tanto las ratas como los ratones mostraban signos de apnea, con la correspondiente disminución del ritmo respiratorio y del volumen respiratorio-minuto. La concentración que provocó

una reducción del 50% del ritmo respiratorio fue 47 mg/m^3 en rata y 51 mg/m^3 en ratón y la concentración umbral de no efecto para este parámetro fue de $0,4 \text{ mg/m}^3$ y 5 mg/m^3 en rata y ratón, respectivamente (PAULUHN, 1996). La concentración umbral de no efecto para el incremento del tiempo de apnea fue de $0,14 \text{ mg/m}^3$ en rata.

Con respecto a los datos de toxicidad subaguda, PAULUHN (1996) describe un ensayo de toxicidad subaguda por inhalación (28 días) en ratas, divididas en cuatro grupos; el grupo control fue expuesto al vehículo (PEG 400) utilizado para disolver ciflutrin y los grupos tratados fueron expuestos a ciflutrin a concentraciones de: $0,44 \text{ mg/m}^3$, 6 mg/m^3 y 47 mg/m^3 , durante 4 semanas consecutivas. Las ratas expuestas a las concentraciones de $0,44 \text{ mg/m}^3$ y 6 mg/m^3 no mostraron síntomas clínicos. Los animales del grupo expuesto a la concentración de ciflutrin de 47 mg/m^3 mostraron piloerección, hiperactividad y bradipnea, efectos que fueron reversibles al cese de la exposición.

El hecho de que ciflutrin produzca la misma respuesta irritatoria en los ensayos de toxicidad aguda (una hora) y subaguda (28 días) por inhalación demuestra que se trata de un agente irritante sensorial y que los efectos son transitorios y no acumulativos y, además, que no se produce un efecto inflamatorio concomitante del tracto respiratorio (PAULUHN, 1996).

Se han desarrollado diversos estudios de toxicidad crónica (2 años) de ciflutrin. En un estudio en ratas, ciflutrin fue administrada a dosis de 50, 150 y 450 ppm en la dieta, determinándose un NOAEL de 50 ppm (equivalente a una dosis de $2 \text{ mg/kg p.c. /día}$). En un estudio en ratones, ciflutrin se administró a dosis de 50, 200 y 800 ppm en la dieta, estableciéndose un NOAEL de 200 ppm (equivalente a una dosis de $30 \text{ mg/kg p.c. /día}$). Otro estudio llevado a cabo en perros tratados (durante 1 año) con ciflutrin a

dosis de 40, 160 y 640 ppm en la dieta, se determinó un NOAEL de 160 ppm (equivalente a una dosis de 5,1 mg/kg p.c. /día). En ninguno de estos estudios de toxicidad crónica mencionados se observaron efectos carcinogénicos originados tras la administración de ciflutrin (BEHRENZ *et al.*, 1983). Basándose en el NOAEL menor identificado de 2 mg/kg p.c. /día para ciflutrin en el estudio de toxicidad crónica (de 2 años) en ratas y aplicando un factor de seguridad de 100, se estimó un valor de ingesta diaria admisible para el hombre (IDA) de 0,2 mg/kg p.c., equivalente a 1,2 mg/persona (FAO, 1987). Sin embargo, el Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos ha fijado un valor de IDA provisional para ciflutrin de 0,001 mg/kg (equivalente a 0,06 mg/persona), basándose en un NOAEL mas bajo de 0,01 mg/kg, identificado en un estudio de neurotoxicidad determinando el test de neurotoxicidad del plano inclinado, y aplicando un factor de seguridad de 10 (EMEA, 1997).

Diversos estudios epidemiológicos del ciflutrin han sido descritos. En un estudio de campo realizado en un poblado minero de India, se impregnaron las mosquiteras con una dosis de ciflutrin de 50 mg/cm² cada seis meses, como medida preventiva contra el mosquito *Anopheles fluviatilis*, vector de malaria. Como resultado de este estudio se observó una disminución significativa en la densidad de vectores, de la tasa de picaduras, de la incidencia de malaria y de ingresos hospitalarios debidos a esta enfermedad. Los usuarios de estas mosquiteras tratadas mostraron ciertos efectos secundarios tales como dolor de cabeza, irritación de la piel, sensación de quemazón, lacrimo, irritación nasal y náuseas, pero estos efectos fueron evaluados como leves y transitorios (SHARMA y YADAV, 1995).

Recientemente, un estudio epidemiológico recogido en el oeste de Francia (Britania) describe la presencia de metabolitos de piretroides [ácido carboxílico

metilciclopropano (*cis*- y *trans*- DCCA), ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico (F-PBA) y ácido carboxílico *cis*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano (*cis*-DBCA)] en la orina de 245 niños de 6 años de edad, lo que podría estar relacionado con la presencia de ciflutrin y otros piretroides en el polvo de las casas (el contenido de piretroides en el polvo de la casa se correlacionó principalmente con el uso de insecticidas piretroides en el hogar como medida frente a una infestación) ó con el consumo de alimentos contaminados (tales como pasta, arroz, sémola, granos y cereales). También se observó en un niño, cuya madre estaba expuesta laboralmente a plaguicidas, presentaba aproximadamente 3 veces más probabilidades de excretar en la orina concentraciones elevadas del metabolito 3-PBA (GLORENNEC *et al.*, 2017).

El último documento de ECHA (2018) de ciflutrin resume la toxicidad describiendo:

- Ciflutrin se absorbe casi por completo, cuando se administra por vía oral, se distribuye ampliamente y se excreta cuantitativamente principalmente en la orina. Ciflutrin es muy tóxico tras administración oral (DL₅₀ en cremophor EL/agua destilada: 16 mg/kg p.c.); es tóxico por inhalación (DL₅₀ 405 mg/m³) y no es muy tóxico tras exposición dérmica. No es irritante ni corrosivo para la piel o los ojos, y no presenta capacidad sensibilizante. Ciflutrin no es genotóxico, ni específicamente teratogénico, ni existe evidencia de potencial carcinógeno. Un NOAEL de 2,0 mg/kg p.c. ha sido identificado en un estudio agudo de neurotoxicidad en ratas y se considera relevante para establecer la dosis de referencia sistémica para una exposición aguda. Similarmente un NOAEL de 2,0 mg/kg p.c./día se ha identificado a partir de un estudio sub-crónico de neurotoxicidad (90 días), considerado también relevante para establecer la dosis de referencia sistémica para una exposición a medio plazo ó subcrónica. Utilizando un factor de seguridad de 100 se establece:

- un **Nivel de Exposición Aceptable sistémico agudo (AEL_{agudo}) de 0,02 mg/kg p.c.**
- un **Nivel de Exposición Aceptable sistémico a medio plazo (AEL_{medio plazo}) de 0,02 mg/kg p.c./día**

ambos “valores guía basados en salud” (AEL_{agudo} y AEL_{medio plazo}) son propuestos para una exposición única y repetida (a medio plazo) de ciflutrin.

Estudios con perros tratados con ciflutrin (6,5 mg/kg p.c./día durante 6 meses; 6 mg/kg p.c./día durante 12 meses) y estudios en ratas tratadas con ciflutrin (12mg/kg de p.c./día durante 2 años) también establecen un **Nivel de Exposición Aceptable sistémico a largo plazo (AEL_{largo plazo}) de 0,02 mg/kg p.c./día.**

Estudios de inhalación aguda en el hombre (con un LOAEC de 0,1 µg/L, 1 h) definen una **Concentración de Exposición Aceptable por inhalación (AEC_{inhalación}) de 0,01 µg/L**, aplicando un factor de seguridad de 10, teniendo en cuenta que el estudio se realizó en humanos; este factor de 10 fue elegido teniendo en cuenta: (i) un factor de 5 para subpoblaciones sensibles (por ejemplo, asmáticos) y (ii) un factor de 2 por la extrapolación de LOAEC a NOAEC en el estudio en humanos donde el LOAEC de 0,1 µg/L se basa en efectos transitorios leves (irritación sensorial en cuatro de cinco sujetos, hallazgos clínicos: hiperemia leve de la mucosa nasal en un sujeto).

Teniendo en cuenta el uso propuesto de ciflutrin para higiene rural así como también residencias, no parecen esperarse residuos de ciflutrin en alimentos o piensos en concentraciones relevantes. De todos modos, porque no se pueden excluir con certeza residuos de ciflutrin en los alimentos, en consideración a los estudios agudos de neurotoxicidad en ratas (NOAEL 2 mg/kg p.c.), se establece como medida de seguridad alimentaria:

- una **Dosis de Referencia Aguda (ARfD) de 0,02 mg/kg p.c.**
- una **Ingesta Diaria Aceptable (ADI) de 0,02 mg/kg p.c.**

3.4. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se conoce que la evaluación y gestión del riesgo de cualquier agente químico o xenobiótico conlleva dos aspectos fundamentales: (1) el conocimiento de los diferentes lugares orgánicos que alcanza el xenobiótico y su comportamiento cinético, y (2) el conocimiento de efectos tóxicos y mecanismos de acción, incluyendo la relación dosis-respuesta.

En base a todo lo descrito, y dado que los estudios toxicocinéticos de los piretroides son limitados, el primer objetivo de la presente memoria es evaluar la toxicocinética del piretroide ciflutrin, investigación no desarrollada hasta el momento.

Es conocido que la toxicocinética abarca el estudio del curso, en el organismo corporal, de las concentraciones en el tiempo de un agente xenobiótico. La toxicocinética nos proporciona datos cuantitativos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME), los cuatro procesos claves fisiológicos que gobiernan el curso en el tiempo de un agente químico en el organismo, lo que básicamente ayudará a comprender posteriores acciones biológicas de dicho compuesto. Los datos toxicocinéticos marcan la base para los posteriores estudios toxicodinámicos.

Una vez que el tóxico se ha absorbido y llega a circulación sistémica debe alcanzar su lugar de acción a una concentración suficiente y durante un periodo de tiempo óptimo para originar una respuesta biológica: proceso de distribución. En nuestro estudio, el primer objetivo fue evaluar los procesos ADME, haciendo hincapié en el conocimiento de la distribución tisular del piretroide ciflutrin principalmente a nivel del sistema nervioso central con el fin de relacionar su presencia en el cerebro con su potencial acción neurotóxica. El estudio de la toxicocinética del piretroide ciflutrin nos proporcionará información sobre los órganos-diana y el tiempo que el piretroide puede persistir en el organismo corporal, incluyendo la predicción de su acumulación.

En conclusión la primera parte de nuestro estudio, o primer objetivo, abarca la toxicocinética del piretroide ciflutrin tras exposición IV y oral en ratas Wistar incluyendo:

- 1. El estudio de la absorción del piretroide ciflutrin tras administración IV y oral.**
- 2. El estudio de la distribución tisular en regiones cerebrales del piretroide ciflutrin tras administración oral.**

Los piretroides claramente están clasificados como compuestos neurotóxicos. El lugar primario de acción de los insecticidas piretroides son los canales de sodio voltaje-dependientes, sin embargo muchos de los efectos neurotóxicos no pueden ser explicados únicamente por dicho mecanismo de acción.

La información limitada disponible sobre los mecanismos de acción específicos de los piretroides sobre el sistema nervioso central en mamíferos, específicamente sobre la alteración de los niveles de los neurotransmisores serotonina y dopamina y metabolitos, nos ha llevado a proponer **como segunda parte de nuestro estudio o segundo objetivo incluyendo:**

- 1. El estudio del efecto del piretroide ciflutrin sobre los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA) y tasa de recambio (5-HT/5-HIAA) en regiones cerebrales de ratas.**
- 2. El estudio el efecto del piretroide ciflutrin sobre los niveles de dopamina (DA), y sus metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) y tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en regiones cerebrales de ratas.**

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Ciflutrin, piretroide seleccionado para el presente estudio, fue donado por Bayer AG, Wuppertal – Eldberfeld, Germany, definido como una mezcla de 4 pares de enantiomeros diastereoisomeros [enantiomero par I (*cis*) (23,6%), enantiomero par II (*cis*) (17,9%), enantiomero par III (*trans*) (31,6%) y enantiomero par IV (*trans*) (21,1 %)], 94 % de pureza.

4.1. ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y ORAL

En el presente trabajo se han utilizado 160 ratas macho Wistar de 8 semanas de edad, de peso corporal 200-210 g. La fase experimental del estudio se realizó en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (nº Registro 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de policarbonato, con un lecho de serrín y alimentadas con una dieta para roedores y agua *ad libitum*. La temperatura del animalario fue de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa del $50 \pm 10\%$. Los animales en estas condiciones se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00) y aire purificado. Todos los experimentos fueron aprobados y autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

4.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

En este estudio, 80 animales (ratas de peso corporal de 200-210 g) fueron distribuidos de forma randomizada en 8 grupos (A, B, C, D, E, F, G, H) (A-H) de 10

animales/grupo. Los animales recibieron una dosis única intravenosa (IV) de 3 mg ciflutrin/kg p.c.; la administración IV se realizó en la vena lateral de la cola de la rata. El vehículo utilizado para disolver el piretroide para la administración IV fue glicerol-formal: disolver 30 mg de ciflutrin en 5 mL de glicerol-formal (6 mg/mL); inyectar 0,1 mL/rata de 200 g (0,6 mg/rata) equivalente a 3 mg/kg p.c.

4.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO TOXICOCINÉTICO DE CIFLUTRIN TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL

En este estudio, 80 animales (ratas de peso corporal de 200-210 g) fueron distribuidos de forma randomizada en 8 grupos (I, J, K, L, M, N, Ñ, O) (I-O) de 10 animales/grupo y recibieron una dosis única oral de 20 mg ciflutrin/kg p.c. El piretroide se administró por gavaje o intubación gástrica. El vehículo utilizado para disolver el piretroide para la administración oral fue aceite de maíz: disolver 80 mg de ciflutrin en 10 mL de aceite de maíz (8 mg/mL); administrar por intubación gástrica 0,5 mL/rata de 200 g p.c. (4 mg/rata) equivalente a 20 mg/kg p.c.

La dosis IV de 3 mg ciflutrin/kg p.c. y la dosis oral de 20 mg/kg p.c. fueron elegidas porque en estudios preliminares realizados no causaron signos clínicos de toxicidad que pudiera complicar el análisis de los datos toxicocinéticos, además estas dosis garantizaban concentraciones plasmáticas y tisulares que podían ser cuantificadas con precisión por cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas (LC/MS).

En los estudios toxicocinéticos de ciflutrin tras administración IV y oral, en cada grupo (total 8 grupos), los animales fueron sacrificados por decapitación seguido de exanguinación; las muestras de sangre se recogieron en jeringas heparinizadas, a los tiempos de 0,16; 0,33; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12 y 24 horas tras la administración de ciflutrin. El plasma se obtuvo por centrifugación (10 minutos, 4000 g, a 4 °C en centrífuga

refrigerada Sorvall Instruments RC5C) y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de la concentración del piretroide por LC/MS.

A continuación de la recogida de las muestras de sangre, tras la administración oral, rápidamente se aisló el cerebro y se procedió a la disección de las regiones cerebrales, hipotálamo, corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado. Todos los tejidos se pesaron individualmente por animal y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis de la concentración del piretroide por LC/MS.

4.1.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE CIFLUTRIN EN PLASMA Y EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) se viene usando para la detección y cuantificación de plaguicidas en sangre, cerebro, grasa e hígado de ratas incluidos piretroides tales como cipermetrin, deltametrin, esfenvalerato, *cis*-permetrin, *trans*-permetrin y β -ciflutrin (STARR *et al.*, 2012; STARR *et al.*, 2014; GAMMON *et al.*, 2015) y también para la detección de metabolitos en orina humana (BAKER *et al.*, 2004; OLSSON *et al.*, 2004).

Procedimiento de extracción

La extracción de ciflutrin en muestras de plasma y tejido de regiones cerebrales fue realizada según describe GODIN *et al.* (2010) con algunas modificaciones.

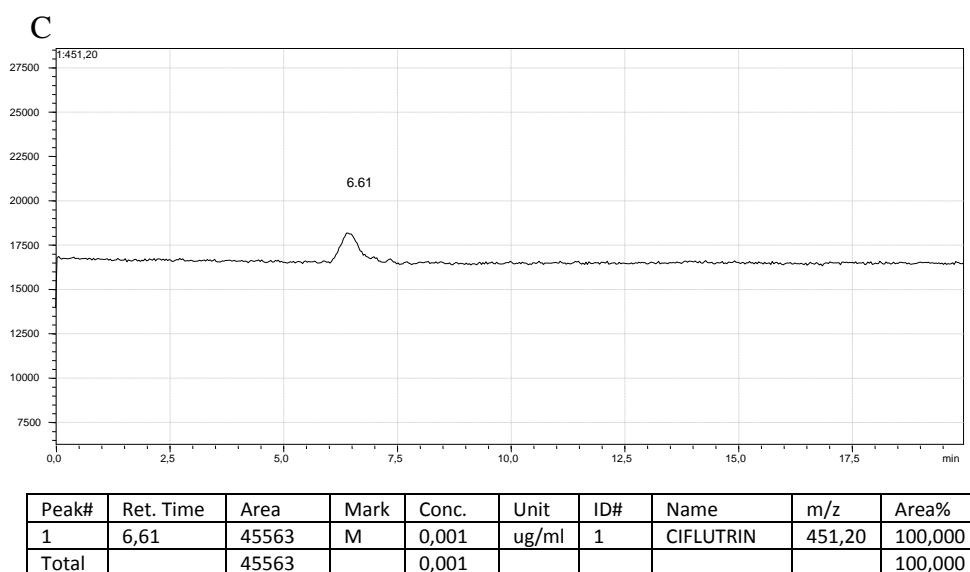
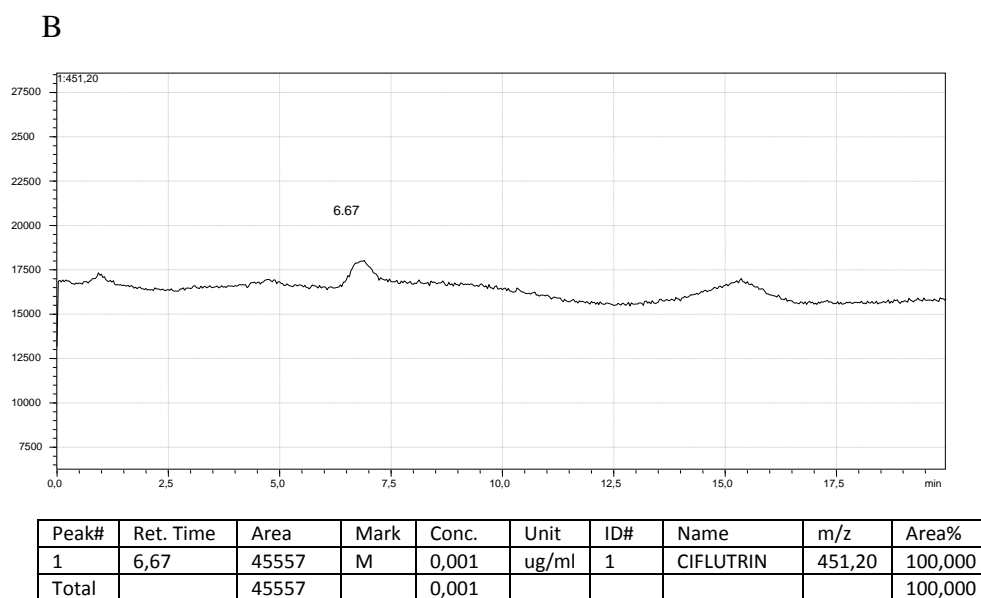
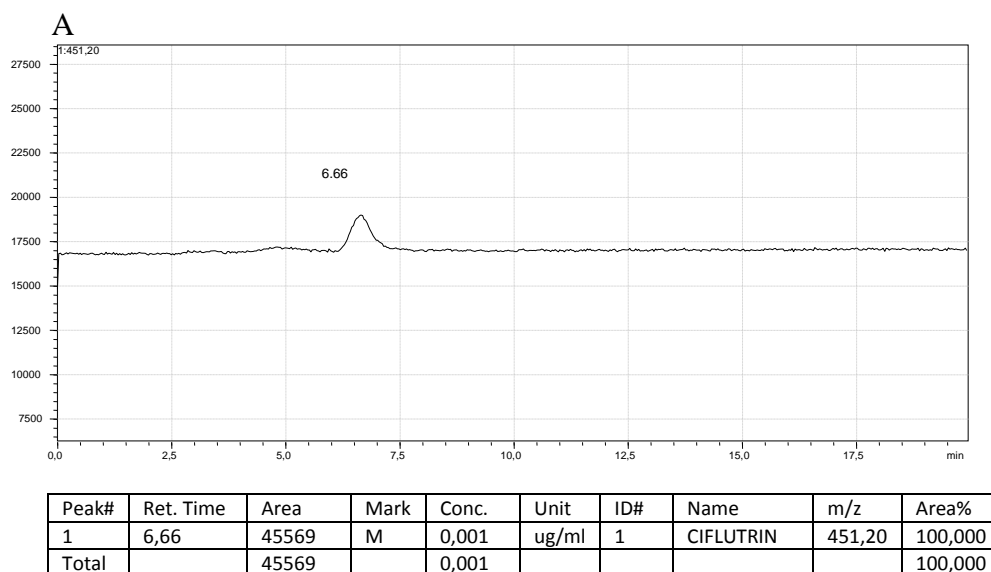
Las muestras tisulares de las regiones cerebrales hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal (30-250 mg, dependiendo de la región) fueron individualmente homogenizadas en 1 mL de agua ultrapura mediante ultrasonido (2 minutos a 40 W utilizando una aguja de titanio acoplada a un homogenizador ultrasónico Labsonic U/Braun, B. Braun Melsungen AG) a 4 °C. Las muestras de

plasma (1 mL) y las regiones cerebrales homogenizadas se extrajeron con 5 mL de acetona: hexano (2:8, v/v), tras su mezcla y agitación durante 10 min se sometieron a centrifugación (10 minutos, 6900 rpm, a 4 °C en centrífuga refrigerada Sorvall Instruments RC5C). La fracción orgánica fue recolectada. La extracción se repitió dos veces más con 3 mL de acetona: hexano (2:8, v/v), y las fracciones orgánicas se combinaron. Las fracciones orgánicas se secaron bajo una corriente de nitrógeno a 30 °C y se reconstituyeron en 1 mL de metanol: agua (9:1, v/v). Se inyectó una alícuota de 50 µl en el sistema LC/MS para el análisis de ciflutrin.

Determinación de ciflutrin en plasma y tejidos por LC/MS

El análisis por LC/MS del piretroide ciflutrin en plasma y regiones cerebrales fue realizado usando un sistema de cromatografía líquida Shimadzu LC-2020 (Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japan) equipado con dos bombas LC-20 AD y un espectrómetro de masas simple cuadrupolo LC/MS QP 2020, equipado con un sistema de control CBM-20A, un inyector manual 7725i y una válvula de desvío de flujo FCV-20AH₂. El software LC/MS solution Version 5 (Shimadzu, Kyoto, Japan) fue usado para la adquisición y procesamiento de los datos. El análisis MS fue realizado mediante ionización electrospray en modo ion positivo (ESI⁺) y desarrollado en el modo de selección de ión (SIM). El detector del MS operó con nitrógeno como gas nebulizador a un flujo de 1,5 L/min. La temperatura de interfase fue de 350 °C y el voltaje de 4,5 kV. La temperatura de la línea de desolvación (DL) se estableció en 250 °C. La identificación y cuantificación de ciflutrin se realizó en base a la masa/carga (*m/z*) 451,2. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: formato de amonio 5mM (95:5, v/v), en modo isocrático, con un flujo de 0,3 mL/min. La columna utilizada fue una Teknokroma Mediterranea SEA C₁₈ 3 µm, 100 mm x 4,6 mm (Teknokroma Analítica S.A., Barcelona, España). Ciflutrin se cuantificó usando una curva de

calibrado con 5 puntos preparadas en cada muestra matriz (plasma, hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal) Las soluciones estándar de calibración fueron en un rango de 1 a 3000 ng/mL. Las curvas de calibración fueron preparadas adicionando cantidades apropiadas de ciflutrin a las muestras de plasma y los distintos tejidos cerebrales de animales no tratados, homogeneizadas, extraídas y reconstituidas en 1 mL de metanol:H₂O (9:1, v/v). Las curvas de calibración a partir de las muestras de plasma y regiones cerebrales enriquecidas con ciflutrin fueron lineales en el rango de calibración de 1 a 3000 ng/mL como se determinó por el uso del análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados. El estándar de calibración más bajo usado fue considerado como el límite de cuantificación (LOQ). La recuperación absoluta para plasma y tejidos cerebrales fue calculada a partir de las áreas de los picos de las muestras enriquecidas con ciflutrin a concentraciones de 10, 750 y 2000 ng/mL (n=5). La recuperación media de ciflutrin en el plasma y los tejidos cerebrales fue mayor del 94% y 85%, respectivamente en todas las concentraciones ensayadas. Los coeficientes de precisión intra-día e inter-día fueron <6%. No se observó ninguna interferencia a partir de sustancias endógenas u otros componentes de la matriz en el tiempo de retención de ciflutrin en las muestras blanco de plasma y tejidos cerebrales de ratas no tratadas lo cual nos indica que el método utilizado fue selectivo para la sustancia analizada ciflutrin (Figura 6).



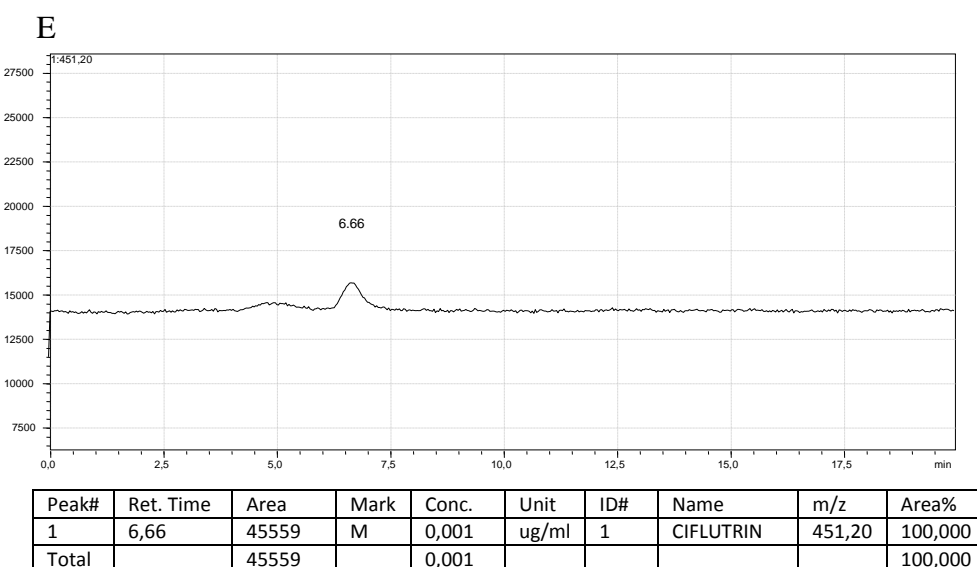
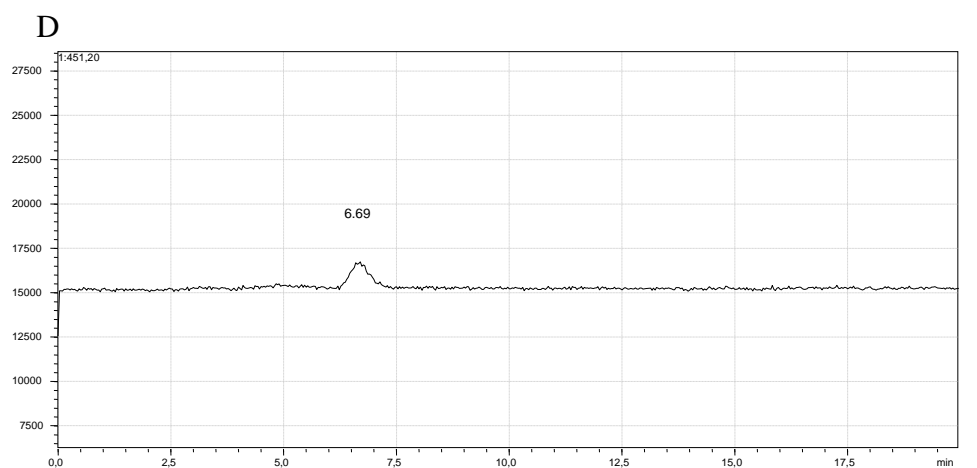


Figura 6. Cromatogramas de (A) plasma, (B) hipotálamo, (C) cuerpo estriado, (D) hipocampo y (E) corteza frontal, muestras enriquecidas con el límite más bajo de cuantificación. (LOQ 1 ng/mL).

4.1.4. ANÁLISIS DE DATOS

Las concentraciones plasmáticas y tisulares de ciflutrin *versus* tiempo se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental utilizando el software informático Phoenix (Version 8.0; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo que mejor se ajusta fue seleccionado sobre la base de los criterios de información de Akaike y Schwartz (SCHWARTZ, 1978; YAMAOKA *et al.*, 1978). El modelo bicompartimental fue el ajuste más adecuado para todos los grupos de animales, y se utilizó para determinar los parámetros cinéticos (GABRIELSSON y WEINER, 2000).

Las curvas de concentraciones plasmáticas y tisulares *versus* tiempo de ciflutrin y las curvas de concentración plasmática y tisular medias de ciflutrin *versus* tiempo tras la administración IV y oral fueron ajustadas a las siguientes ecuaciones exponenciales:

$$C = A_1 \times e^{-\alpha t} + A_2 \times e^{-\beta t} \text{ (administración IV)}$$

$$C = A_1 \times e^{-\alpha t} + A_2 \times e^{-\beta t} - A_3 \times e^{-k_{at}} \text{ (administración oral)}$$

Donde C es la concentración de ciflutrin; A_1 , A_2 , A_3 son coeficientes matemáticos, α es la constante híbrida para la fase de distribución, β es la constante híbrida de la fase de eliminación, K_a es la constante de absorción de primer orden y t es el tiempo.

El modelo farmacocinético bicompartimental considera el organismo corporal dividido en dos compartimentos:

(1) El compartimento central formado por el plasma, los fluidos intersticiales y el agua intracelular asequible (tejidos bien irrigados). Por definición, la distribución de un medicamento en todos los elementos del compartimento central sería instantánea, y su concentración uniforme e igual a la existente en el plasma.

(2) El compartimento periférico constituye el agua intracelular profunda (tejidos poco vascularizados) y los depósitos no acuosos (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos intracelulares). En este caso, un agente químico o xenobiótico accedería a este compartimento más lentamente desde el plasma, transcurriendo un tiempo antes de la consecución del equilibrio de la concentración del agente químico en el organismo.

En el compartimento central se materializan los procesos de eliminación del agente químico o xenobiótico por metabolismo y excreción, regidos por una constante de eliminación (K_{10}). Además, este compartimento canaliza el proceso de distribución de un agente químico al compartimento periférico (K_{12}), y, en el caso de administración extravasal, también el proceso de absorción, caracterizado por la constante de absorción (K_a).

En el compartimento periférico, desprovisto de mecanismos metabólicos y excretores de importancia, el xenobiótico permanece depositado pasivamente y su retorno al plasma (regido por la constante de retorno K_{21}) depende del grado de eliminación en el compartimento central y de la afinidad que presente el xenobiótico hacia los depósitos no acuosos.

Aunque la velocidad de acceso del agente químico a los diferentes elementos del compartimento periférico no es la misma y la velocidad de retorno al compartimento central tampoco lo es, en la práctica los retrasos en la distribución y en el retorno se consideran aditivos y están cuantificados globalmente por las constantes K_{12} y K_{21} . Del mismo modo, la constante de absorción (K_a) engloba las de liberación y absorción, y la constante de eliminación (K_{10}) engloba las de metabolismo y excreción (WAGNER, 1975, 1976) (Figura 7).

Se asume que los procesos de distribución y eliminación asociados con este modelo obedecen a cinéticas de primer orden, lo que significa que la velocidad con la

que un agente químico se absorbe y se elimina a partir del compartimento central es proporcional a la concentración del xenobiótico en dicho compartimento.

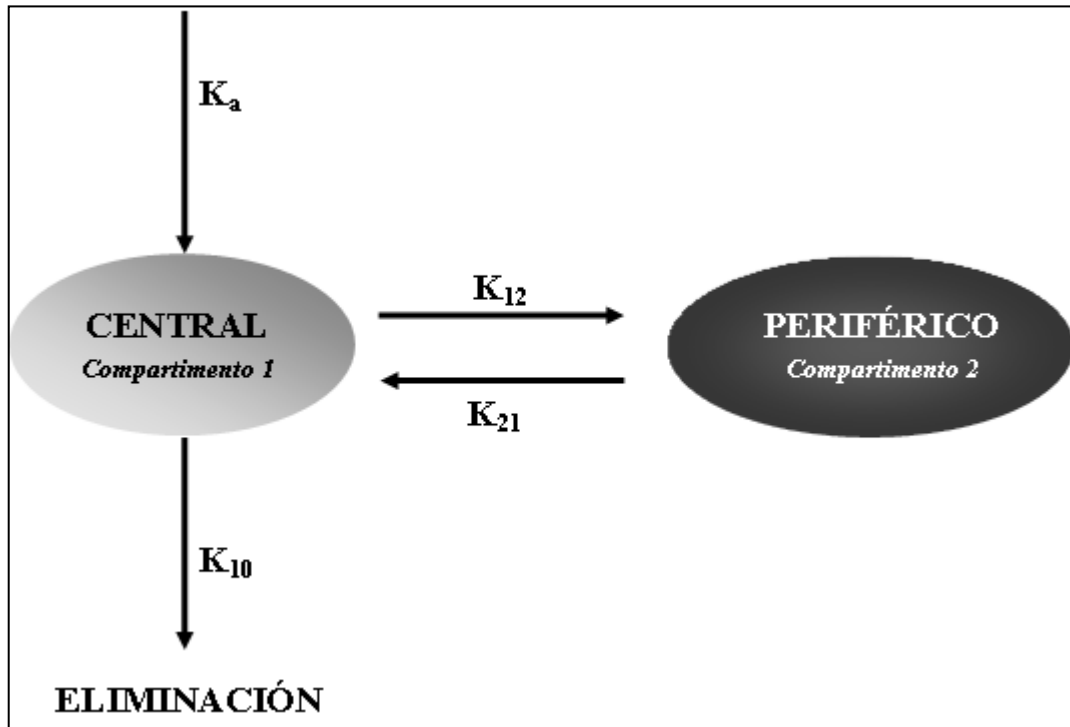


Figura 7. Modelo cinético bicompartimental

Adicionalmente se determinaron los siguientes parámetros:

$t_{1/2a}$: Semivida de absorción

$t_{1/2\alpha}$: Semivida de distribución de la fase α

$t_{1/2\beta}$: Semivida de eliminación de la fase β

K_{12} : Constante de distribución desde el compartimento central al compartimento periférico:

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

K_{21} : Constante de retorno desde el compartimento periférico al compartimento central:

$$K_{21} = \frac{A_1 \cdot \beta + A_2 \cdot \alpha}{A_1 + A_2} \text{ (administración IV)}$$

$$K_{21} = \frac{(A_1 \beta K_a + A_2 \alpha K_a - A_3 \alpha \beta)}{A_1(K_a - \alpha) + A_2(K_a - \beta)} \text{ (administración oral)}$$

K_{10} : Constante de eliminación:

$$K_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{K_{21}}$$

$AUC_{(0-24)}$: área bajo la curva concentración *versus* tiempo:

$$AUC_{(0-24)} = (A_1/\alpha) + (A_2/\beta) \text{ (administración IV)}$$

$$AUC_{(0-24)} = (A_1/\alpha) + (A_2/\beta) - (A_3/K_a) \text{ (administración oral)}$$

MRT : Tiempo medio de residencia:

$$MRT = \frac{\frac{A_1}{\alpha^2} + \frac{A_2}{\beta^2}}{AUC} \text{ (administración IV)}$$

$$MRT = \frac{\frac{A_1}{\alpha^2} + \frac{A_2}{\beta^2} - \frac{A_3}{K_a^2}}{AUC} \text{ (administración oral)}$$

F : biodisponibilidad oral la cual se calculó por la razón entre el valor de la $AUC_{(0-24)}$ oral para cada grupo de ratas y el valor medio de la $AUC_{(0-24)}$ IV de todos los grupos usados en el estudio de administración IV, al no utilizarse las mismas ratas para la dosis oral y para la dosis IV.

$$F = \frac{AUC_{oral}}{AUC_{i.v.}} \times \frac{\text{dosis i.v.}}{\text{dosis oral}}$$

CL : Aclaramiento plasmático total (“Clearance”):

$$CL = \frac{\text{Dosis}}{AUC} \text{ (administración IV)}$$

$$CL = \frac{\text{Dosis} \times F}{AUC} \text{ (administración oral)}$$

V₁ : Volumen de distribución en el compartimento central:

$$V_1 = (\text{Dosis IV}) / (A_1 + A_2) \text{ (administración IV)}$$

$$V_1 = (\text{Dosis oral} \times F) / (A_1 + A_2) \text{ (administración oral)}$$

V₂ : Volumen de distribución en el compartimento periférico:

$$V_2 = (V_1) / (K_{12} / K_{21}) \text{ (administración IV)}$$

$$V_2 = (V_1 \times F) / (K_{12} / K_{21}) \text{ (administración oral)}$$

V_{d(ss)} : Volumen aparente de distribución en el estado estacionario:

$$V_{d(ss)} = MRT \times CL \text{ (administración IV)}$$

C_{max} : Concentración máxima tras la administración oral de ciflutrin y el tiempo en el cual se alcanza la C_{max} (T_{max}) fueron determinados directamente de la curva concentración *versus* tiempo.

El tiempo medio de absorción (MAT) se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación (RIEGELMAN y COLLIER, 1980):

$$MAT = MRT_{\text{oral}} - MRT_{\text{IV}}$$

Los valores de los parámetros cinéticos se expresaron como valores medios ± D.S.

El análisis estadístico se realizó utilizando el test *t*-Student.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Para este estudio, 25 ratas Wistar machos fueron distribuidos de forma randomizada en 5 grupos (5 animales por grupo), un grupo control y 4 grupos tratados con ciflutrin a diferentes dosis. A los animales de los grupos tratados se les administró oralmente ciflutrin a dosis de 1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c. (equivalente a 1/250, 1/50, 1/25 y 1/12,5 del valor de la DL_{50} oral de ciflutrin) durante 6 días consecutivos. Los 5 grupos control y tratados con ciflutrin fueron desprovistos de alimento 6 h antes de la administración oral de ciflutrin, pero se les permitió agua *ad libitum*. Los animales recibieron el tratamiento cada día a la misma hora, entre las 10 y 11 h. El piretroide ciflutrin fue disuelto en aceite de maíz y fue administrado en forma oral por gavaje; el vehículo utilizado para disolver el piretroide para la administración oral (1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c) fue aceite de maíz: (1) disolver 2 mg de ciflutrin en 10 mL de aceite de maíz (0,2 mg/mL), administrar por intubación gástrica 1 mL/rata de 200 g p.c. (0,2 mg/rata) equivalente a 1 mg/kg p.c.; (2) disolver 10 mg de ciflutrin en 10 mL de aceite de maíz (1 mg/mL), administrar por intubación gástrica 1 mL/rata de 200 g p.c. (1 mg/rata) equivalente a 5 mg/kg p.c.; (3) disolver 20 mg de ciflutrin en 10 mL de aceite de maíz (2 mg/mL), administrar por intubación gástrica 1 mL/rata de 200 g p.c. (2 mg/rata) equivalente a 10 mg/kg p.c.; y (4) 40 mg de ciflutrin en 10 mL de aceite de maíz (4

mg/mL), administrar por intubación gástrica 1 mL/rata de 200 g p.c. (4 mg/rata) equivalente a 20 mg/kg p.c.

Diariamente se monitorizó el peso corporal de los animales, el consumo de alimento y agua durante todo el estudio. Veinticuatro horas después de la última administración de ciflutrin y de aceite de maíz (grupo control), los animales fueron sacrificados por decapitación. El cerebro se aisló rápidamente, diseccionando (a 4 °C) las regiones cerebrales hipotálamo, mesencéfalo, corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo, según el procedimiento descrito por GLOWINSKI y IVERSEN (1966). Las muestras obtenidas de hipotálamo, corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y mesencéfalo se pesaron individualmente y a continuación se homogenizaron a 4 °C por ultrasonido (2 minutos a 40 W utilizando una aguja de titanio acoplada a un homogenizador ultrasónico Labsonic U/Braun, B. Braun Melsungen AG) en 300-800 µL de solución de ácido perclórico 0,4M y metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 0,1% (p/v). Seguidamente los homogenizados se sometieron a centrifugación (20 min, 12000 rpm a 4 °C en centrifuga refrigerada Sorvall Instruments RC5C), recogándose a continuación el sobrenadante que se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis de los niveles de los neurotransmisores y metabolitos (5-HT, 5-HIAA, DA, DOPAC, HVA) por HPLC con detección electroquímica según describe COLADO *et al.*, (1993) con modificaciones.

4.2.2. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE SEROTONINA Y METABOLITO ÁCIDO 5-HIDROXI-3-INDOLACÉTICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se tomaron 20 µL del sobrenadante del homogenizado, de cada una de las regiones cerebrales, almacenado a -80°C y se inyectaron en un sistema cromatográfico equipado con una columna de fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C₁₈ de 5 µm

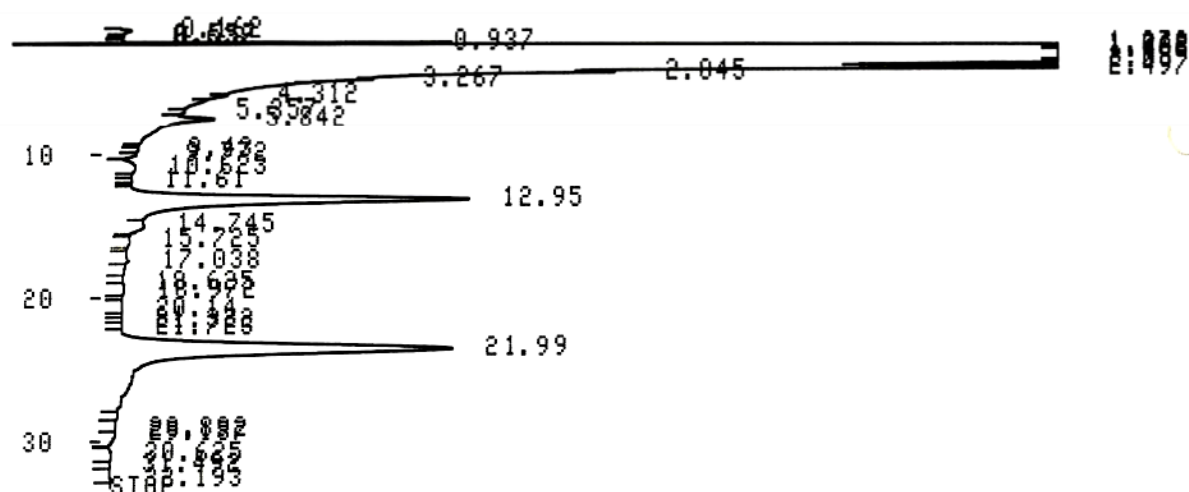
(partícula de relleno), 125 mm x 4 mm de diámetro interno con pre-columna Teknokroma ODS TR-C-160-1. El sistema cromatográfico (HPLC) utilizado fue un Shimadzu modelo LC-9A equipado con un detector electroquímico Shimadzu L-ECD-6A, y un integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvil se utilizó una mezcla de monofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1 M (pH=3,5) y metanol (450:450:70 v:v:v); EDTA 0,9 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 1,6 mM. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,63 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia (Ag/AgCl). Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron usando una curva de calibrado con 5 puntos preparadas en cada muestra matriz (hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo, corteza frontal y mesencéfalo). Las soluciones estándar de calibración fueron en un rango de 0,002 a 1000 ng/mL. Las curvas de calibración fueron preparadas adicionando cantidades apropiadas de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico (HClO_4) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Las curvas de calibración de las muestras de las regiones cerebrales enriquecidas con 5-HT y 5-HIAA fueron lineales en el rango de calibración de 0,002 hasta 1000 ng/mL como se determinó por el uso del análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados. El estándar de calibración mas bajo usado fue considerado como el límite de cuantificación (LOQ). La recuperación media en todos los tejidos cerebrales fue del 100% para 5-HT y 5-HIAA en todas las concentraciones ensayadas. Los coeficientes de precisión intra-día e inter-día fueron <4%, y El método fue selectivo para los compuestos estudiados 5-HT y 5-HIAA, no observándose en los cromatogramas interferencias con otros compuestos endógenos propios del tejido matriz

estudiado. La Figura 8 recoge el cromatograma de muestra blanco de hipotálamo enriquecida con 5-HT y 5-HIAA (100 ng/mL).

4.2.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE DOPAMINA Y METABOLITOS ÁCIDO 3,4-DIHIDROXIFENILACÉTICO Y ÁCIDO HOMOVANÍLICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se tomaron 20 µL del sobrenadante del homogenizado, de cada una de las regiones cerebrales, almacenado a -80°C y se inyectaron en un sistema cromatográfico equipado con una columna de fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C₁₈ de 5 µm (partícula de relleno), 125 mm x 4 mm de diámetro interno con pre-columna Teknokroma ODS TR-C-160-1. El sistema cromatográfico (HPLC) utilizado fue un Shimadzu modelo LC-9A equipado con un detector electroquímico Shimadzu L-ECD-6A, y un integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvil se utilizó una mezcla de monofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇·H₂O) 0,1 M (pH=3,5) y metanol (400:500:70 v:v:v); EDTA 0,9 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 1,6 mM. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,85 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia (Ag/AgCl). Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron usando una curva de calibrado con 5 puntos preparadas en cada muestra matriz (hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo, corteza frontal y mesencéfalo). Las soluciones estándar de calibración fueron en un rango de 0,002 a 1000 ng/mL. Las curvas de calibración fueron preparadas adicionando cantidades apropiadas de DA, y sus metabolitos DOPAC y HVA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico (HClO₄) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v)

de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Las curvas de calibración de las muestras de las regiones cerebrales enriquecidas con DA, DOPAC y HVA fueron lineales en el rango de calibración de 0,002 hasta 1000 ng/mL como se determinó por el uso del análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados. El estándar de calibración más bajo usado fue considerado como el límite de cuantificación (LOQ). La recuperación media en todos los tejidos cerebrales fue del 100% para DA, y sus metabolitos DOPAC y HVA en todas las concentraciones ensayadas. Los coeficientes de precisión intra-día e inter-día fueron <4%. El método fue selectivo para los compuestos estudiados DA, y sus metabolitos DOPAC y HVA, no observándose en los cromatogramas interferencias con otros compuestos endógenos propios del tejido matriz estudiado. La Figura 9 recoge el cromatograma de muestra blanco de hipotálamo enriquecida con DA, y sus metabolitos DOPAC y HVA (100 ng/mL)



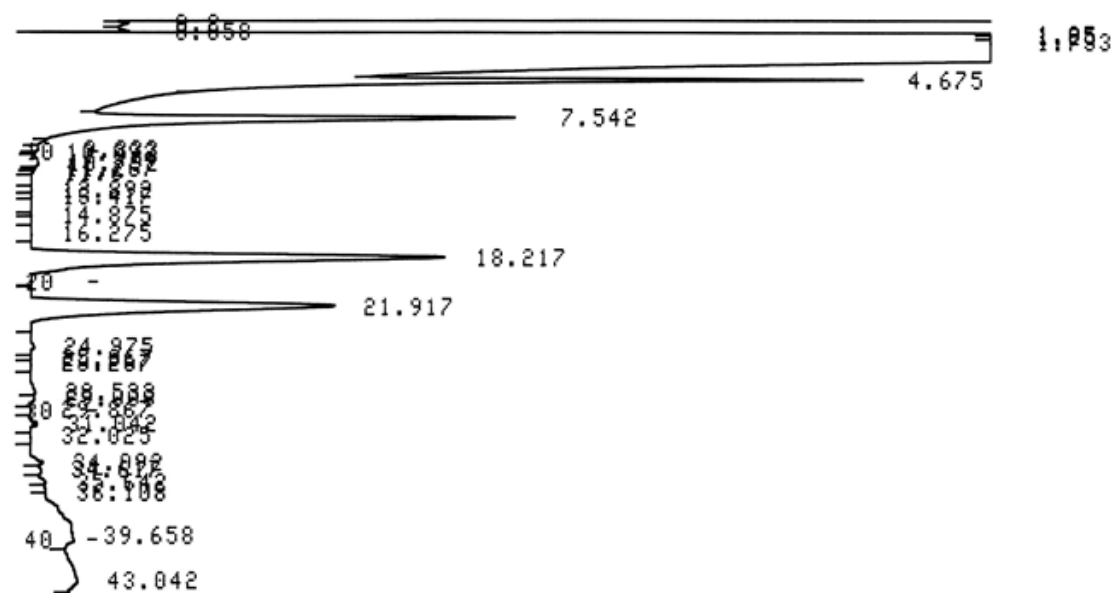
CHROMATOGRAM 4 MEMORIZED

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 6203

FILE 1
METHOD 464
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.162	28524				
2	0.557	23989	V			
3	0.632	22359	V			
4	0.937	64527	V			
5	1.072	1536748	E			
6	1.268	6478577	VE			
7	1.408	16052336	SVE			
8	2.05	30183	T			
9	2.497	122194	T			
10	2.845	8514	T			
11	3.267	1914	T			
12	5.842	12168	TV			
13	7.338	80918	T			
14	9.43	3362	TV			
15	9.772	2864	TV			
16	10.623	5307	T			
17	12.95	231552	TV	1	2.0166	5HIAA
18	14.745	4405	T			
19	15.725	1266				
20	17.038	1793				
21	18.972	1932	V			
22	21.99	325085	S	2	2.1546	5HT
23	28.892	1612				
24	29.187	2432	V			
25	30.625	2591				
26	32.193	1584	V			
TOTAL		25048720			4.1712	

Figura 8. Cromatograma de una muestra de hipotálamo blanco enriquecido con una mezcla estándar de 5-HT y 5-HIAA (100 ng/mL).



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 6061
 STANDARD 3

FILE 2
 METHOD 464
 SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.2	18960				
2	0.858	42437	V			
3	1.05	11552367	E			
4	1.25	13272491	V			
5	1.733	10455504	SV			
6	4.675	191753	T	1	2.095	NA
7	7.542	240094	T	2	2.099	DOPAC
8	10.792	7363	TV			
9	11.267	2069	TV			
10	11.6	2516	TV			
11	12.892	2329	TV			
12	16.275	9699				
13	18.217	423960	V	3	2.061	DA
14	21.917	380801		4	2.116	HVA
15	24.975	62539	V			
16	25.867	11107	V			
17	26.267	23947	V			
18	28.533	58822	V			
19	29.008	27643	V			
20	29.867	17840	V			
21	31.042	37684	V			
22	32.025	9041	V			
23	34.092	26257				
24	34.617	17563	V			
25	35.642	16829	V			
26	36.108	12581	V			
27	39.658	117226	V			
28	43.042	45396	V			
TOTAL		37086776			8.371	

Figura 9. Cromatograma de una muestra de hipotalamo blanco enriquecido con una mezcla estándar de noradrenalina (NA), DA, y sus metabolitos DOPAC y HVA (100 ng/mL).

4.2.4. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software de bioestadística Statgraphics para Windows. Los niveles de 5-HT, DA, los metabolitos y las tasas de recambio, también se presentan como variaciones en porcentaje respecto del control (100%), se expresan como valores medios \pm desviación estándar (D.S.) de 5 animales por grupo. Se ha empleado el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba *post hoc* de Duncan para determinar la diferencia estadística significativa entre los grupos estudiados ($P < 0.05$).

4.3. REACTIVOS

- Ciflutrin: mezcla de 4 pares de enantiomeros diastereoisomeros [enantiomero par I (cis) (23,6%), enantiomero par II (cis) (17,9%), enantiomero par III (trans) (31,6%) y enantiomero par IV (trans) (21,1 %)] 94 % de pureza. (Bayer AG, Wuppertal – Eldberfeld, Germany)
- Acetona (C_3H_6O) 99,5 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- n-Hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) 99 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Formato de amonio (HCO_2NH_4) ≥ 99 % de pureza. (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)
- Serotonina (5-HT) ($C_{10}H_{12}N_2O$) 99 % de pureza. (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)
- Ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA) ≥ 98 % de pureza. ($C_{10}H_9NO_3$) (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)
- Dopamina (DA) ($C_8H_{11}NO_2.HCl$) 98 % de pureza (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)

- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) ($C_8H_8O_4$) 98 % de pureza. (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)
- Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA) ($C_9H_{10}O_4$) 97 % de pureza. (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, USA)
- Di-sodio hidrogenofosfato ($HNa_2O_4P \cdot 2H_2O$) ≥ 99 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido cítrico monohidrato ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 99,5 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido etiléndiaminotetraacético (sal disódica, dihidrato) ($C_{10}H_{14}CaN_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) (EDTA) 99% de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) ($C_8H_{17}O_3SNa$) ~ 98 % de pureza. (Sigma-Aldrich Inc., San Luis -MO, USA)
- Metanol (CH_3OH) grado HPLC 99 % de pureza. (Scharlau S.L., Barcelona, España)
- Ácido perclórico ($HClO_4$) 70 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Sodio disulfito (sodio metabisulfito) ($Na_2O_5S_2$) 98 % de pureza. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN EN PLASMA TRAS ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y ORAL

Los niveles plasmáticos de ciflutrin obtenidos en cada grupo de animales (8 grupos), así como la concentración media plasmática de los 8 grupos, 10 animales/grupo, estudiados tras administración intravenosa y oral de dosis únicas de 3 mg/kg y 20 mg/kg respectivamente, se presentan en las Tablas 10 y 11.

Los niveles plasmáticos de ciflutrin frente al tiempo (Tablas 10 y 11, Figura 10) se ajustaron adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético.

Los valores de los parámetros cinéticos calculados para ciflutrin tras administración intravenosa y oral se presentan en las Tablas 12-16.

La Tabla 16 presenta los parámetros cinéticos medios de ciflutrin tras la administración IV y oral, donde se puede observar que el piretroide ciflutrin se distribuyó más lentamente tras administración oral que tras administración intravenosa; la semivida plasmática de distribución ($t_{1/2\alpha}$) fue de $2,85 \pm 0,51$ h tras la dosis oral frente a $0,122 \pm 0,064$ h tras la dosis IV; la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de ciflutrin tras la dosis oral ($17,15 \pm 1,67$ h) fue algo más prolongada que tras la dosis IV ($13,46 \pm 0,93$ h). El valor del parámetro tiempo medio de residencia (MRT) tras administración IV fue de $16,87 \pm 1,33$ h lo que indica una lenta eliminación del piretroide del organismo corporal. El volumen de distribución en el estado estacionario ($V_{d(SS)}$) tras administración IV fue de $39,65 \pm 3,62$ L/kg. La aclaramiento plasmático corporal total (CL) para ciflutrin fue de $2,36 \pm 0,14$ y $2,34 \pm 0,01$ L/h/kg tras la administración IV y oral, respectivamente.

El piretroide ciflutrin se absorbió rápidamente tras su administración única oral de 20 mg/kg, obteniéndose una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de $1,58 \pm 0,23$ h. La concentración máxima plasmática (C_{max}) de ciflutrin fue de $0,385 \pm 0,051 \mu\text{g/mL}$ y se alcanzó a las $3,39 \pm 0,41$ h (T_{max}) (Tablas 14-16). La fracción de dosis absorbida o biodisponibilidad (F) del ciflutrin fue de $71,60 \pm 12,36 \%$ (Tablas 14-16).

Tabla 10. Niveles plasmáticos de ciflutrin ($\mu\text{g/mL}$) tras administración de dosis única IV de 3 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis IV (h)	$\mu\text{g/mL}$								
	8 grupos de animales (10 animales/grupo)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,450	0,420	0,450	0,53	0,420	0,390	0,410	0,480	$0,444 \pm 0,045$
0,33	0,180	0,120	0,150	0,220	0,160	0,110	0,140	0,210	$0,161 \pm 0,040$
0,5	0,086	0,086	0,083	0,170	0,080	0,080	0,077	0,160	$0,103 \pm 0,039$
1	0,071	0,070	0,067	0,110	0,066	0,065	0,062	0,098	$0,076 \pm 0,018$
2	0,061	0,056	0,055	0,076	0,056	0,052	0,051	0,070	$0,059 \pm 0,009$
4	0,043	0,045	0,041	0,056	0,039	0,041	0,038	0,052	$0,044 \pm 0,006$
6	0,035	0,036	0,037	0,037	0,032	0,033	0,035	0,035	$0,035 \pm 0,002$
8	0,030	0,031	0,033	0,033	0,027	0,029	0,031	0,030	$0,030 \pm 0,002$
12	0,024	0,025	0,027	0,028	0,022	0,023	0,025	0,026	$0,025 \pm 0,002$
24	0,020	0,021	0,021	0,020	0,018	0,019	0,019	0,019	$0,019 \pm 0,001$

Tabla 11. Niveles plasmáticos de ciflutrin ($\mu\text{g/mL}$) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis oral (h)	$\mu\text{g/mL}$								
	8 grupos de animales (10 animales/grupo)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,015	0,016	0,014	0,027	0,028	0,018	0,018	0,019	$0,019 \pm 0,005$
0,33	0,039	0,038	0,035	0,040	0,048	0,028	0,029	0,042	$0,037 \pm 0,007$
0,5	0,053	0,061	0,056	0, 056	0,079	0,062	0,051	0,105	$0,065 \pm 0, 018$
1	0,192	0,175	0,183	0,138	0,239	0,246	0,185	0,210	$0,196 \pm 0,035$
2	0,550	0,425	0,600	0,512	0,651	0,601	0,651	0,710	$0,588 \pm 0,090$
4	0,435	0,325	0,330	0,388	0,412	0,441	0,446	0,541	$0,415 \pm 0,070$
6	0,400	0,238	0,235	0,276	0,301	0,341	0,341	0,398	$0,316 \pm 0,065$
8	0,338	0,188	0,185	0,214	0,242	0,262	0,249	0,291	$0,246 \pm 0,052$
12	0,160	0,111	0,111	0,117	0,141	0,181	0,139	0,159	$0,140 \pm 0,026$
24	0,087	0,048	0,059	0,056	0,073	0,089	0,071	0,075	$0,070 \pm 0,015$

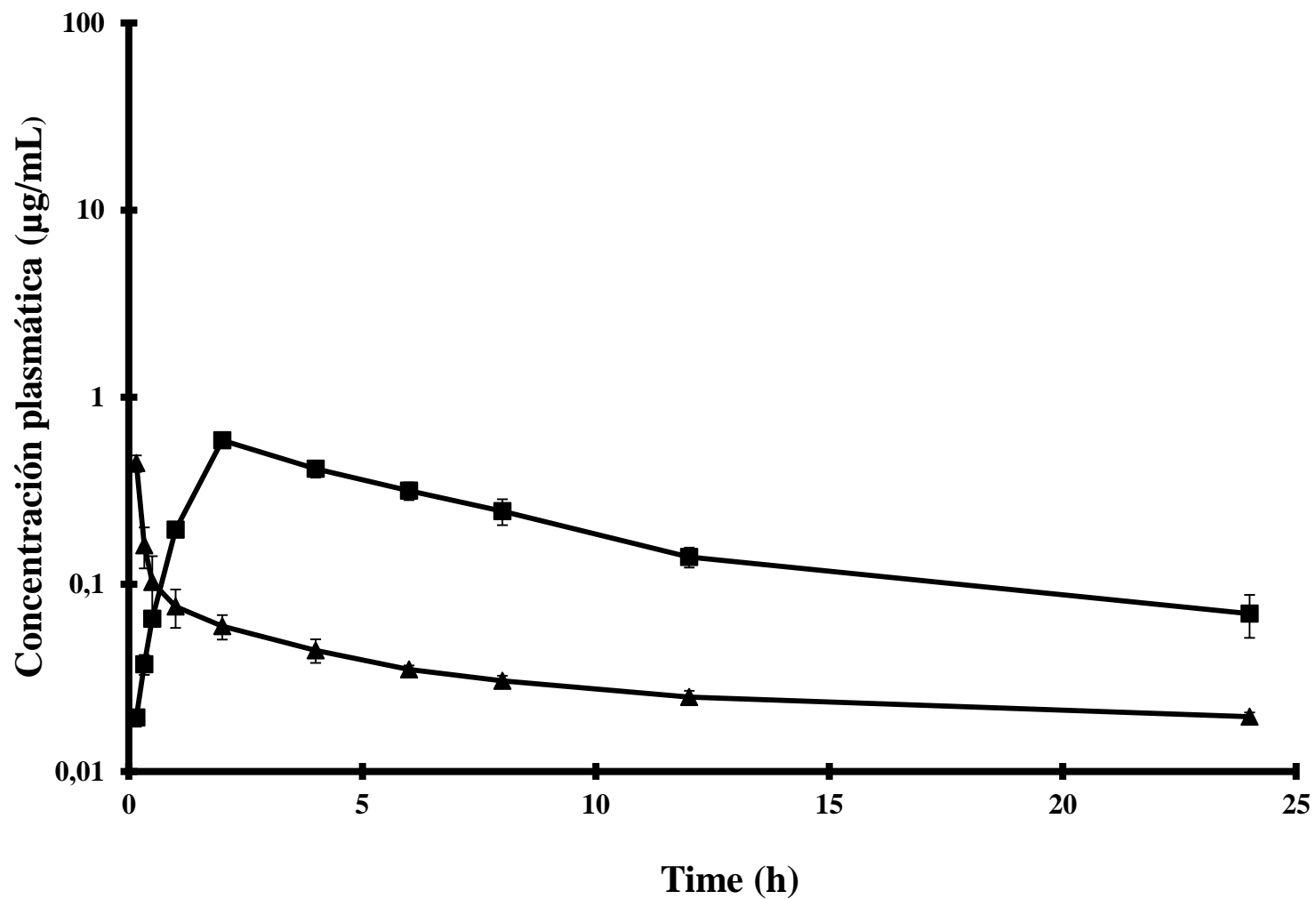


Figura 10. Niveles plasmáticos de ceflutrin tras administración de dosis única IV (\blacktriangle) 3 mg/kg p.c. y oral (\blacksquare) de 20 mg/kg p.c. Cada punto representa el valor medio de 8 ratas. La D.S. está indicada por las barras, los símbolos sin barras indican que la D.S. está dentro de los símbolos

Tabla 12. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única IV de 3 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles plasmáticos *versus* tiempo en 8 grupos (A-H) de animales (10 animales/grupo)

Parámetro	8 grupos de animales							
	A	B	C	D	E	F	G	H
A ₁ (µg/mL)	1,20	1,40	1,41	0,62	1,18	1,27	1,27	0,58
A ₂ (µg/mL)	0,058	0,057	0,056	0,066	0,053	0,053	0,052	0,061
α (h ⁻¹)	7,01	8,70	8,05	3,07	7,28	8,66	7,95	3,10
β (h ⁻¹)	0,053	0,049	0,047	0,056	0,054	0,050	0,048	0,055
t _{1/2} α (h)	0,100	0,079	0,086	0,226	0,095	0,080	0,087	0,223
t _{1/2} β (h)	13,07	14,15	14,69	12,21	12,74	13,87	14,39	12,55
V ₁ (L/kg)	2,38	2,06	2,04	4,34	2,44	2,27	2,27	1,46
V ₂ (L/kg)	36,21	38,35	38,57	28,63	38,79	41,25	41,34	31,57
V _{d(ss)} (L/kg)	38,59	40,41	40,61	32,96	41,23	43,52	43,61	36,25
K ₁₂ (h ⁻¹)	5,69	7,27	6,67	2,27	5,90	7,23	6,57	2,31
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,374	0,391	0,352	0,345	0,371	0,399	0,362	0,343
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,993	1,09	1,08	0,505	1,06	1,09	1,06	0,500
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	1,27	1,33	1,37	1,37	1,15	1,22	1,25	1,28
MRT (h)	16,32	17,97	18,48	15,04	15,83	17,63	18,13	15,52
CL (L/h/kg)	2,36	2, 25	2,19	2,19	2,60	2,46	2,40	2,33

Tabla 13. Parámetros cinéticos medios de ciflutrin tras administración de dosis única IV de 3 mg/kg p.c.

Parámetro	Valor medio \pm D.S. (n=8)
A ₁ (μg/mL)	1,12 \pm 0,33
A ₂ (μg/mL)	0,057 \pm 0,005
α (h ⁻¹)	6,73 \pm 2,32
β (h ⁻¹)	0,052 \pm 0,003
t _{1/2} α (h)	0,122 \pm 0,064
t _{1/2} β (h)	13,46 \pm 0,93
V ₁ (L/kg)	2,41 \pm 0,84
V ₂ (L/kg)	36,84 \pm 4,54
V _{d(ss)} (L/kg)	39,65 \pm 3,62
K ₁₂ (h ⁻¹)	5,49 \pm 2,05
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,365 \pm 0,022
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,923 \pm 0,261
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	1,28 \pm 0,08
MRT (h)	16,87 \pm 1,33
CL (L/h/kg)	2,36 \pm 0,14

Tabla 14. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles plasmáticos *versus* tiempo en 8 grupos (I-O) de animales (10 animales/grupo)

Parámetro	Grupo de animales							
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O
A ₁ (µg/mL)	0,863	1,44	0,885	1,42	1,21	2,21	1,63	1,67
A ₂ (µg/mL)	0,207	0,102	0,143	0,165	0,161	0,233	0,159	0,173
A ₃ (µg/mL)	1,07	1,54	1,03	1,59	1,37	2,44	1,79	1,84
α (h ⁻¹)	0,171	0,233	0,272	0,271	0,251	0,269	0,264	0,259
β (h ⁻¹)	0,044	0,039	0,039	0,049	0,036	0,044	0,038	0,038
K _a (h ⁻¹)	0,419	0,367	0,596	0,432	0,486	0,385	0,444	0,455
t _{1/2α} (h)	4,06	2,98	2,55	2,55	2,77	2,57	2,62	2,67
t _{1/2β} (h)	15,80	17,81	17,62	14,22	19,00	15,82	18,44	18,45
t _{1/2a} (h)	1,66	1,89	1,16	1,60	1,43	1,80	1,56	1,52
V ₁ (L/kg)	15,81	7,01	11,79	7,30	10,96	6,88	8,35	8,89
V ₂ (L/kg)	6,86	3,95	8,09	3,79	9,57	5,66	7,65	8,77
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,040	0,070	0,102	0,087	0,093	0,095	0,097	0,094
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,078	0,067	0,090	0,097	0,080	0,097	0,079	0,078
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,096	0,134	0,119	0,136	0,115	0,121	0,126	0,125
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	7,23	4,61	5,17	4,94	6,41	7,17	6,37	6,99
F (%)	84,61	54,02	60,59	57,89	75,11	84,02	74,65	81,91
MRT (h)	18,03	17,82	19,94	16,10	21,47	18,75	19,53	19,43
CL (L/h/kg)	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34	2,34
C _{max} (µg/mL)	0,410	0,301	0,348	0,338	0,396	0,426	0,409	0,453
T _{max} (h)	4,09	3,72	2,75	3,31	3,19	3,62	3,25	3,22

Tabla 15. Parámetros cinéticos medios de ciflutrin tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Parámetro	Valor medio \pm D.S. (n=8)
A ₁ (μg/mL)	1,42 \pm 0,44
A ₂ (μg/mL)	0,168 \pm 0,039
A ₃ (μg/mL)	1,58 \pm 0,46
α (h ⁻¹)	0,249 \pm 0,034
β (h ⁻¹)	0,041 \pm 0,004
K _a (h ⁻¹)	0,448 \pm 0,071
t _{1/2} α (h)	2,85 \pm 0,51
t _{1/2} β (h)	17,15 \pm 1,67
t _{1/2a} (h)	1,58 \pm 0,23
V ₁ (L/kg)	9,62 \pm 3,09
V ₂ (L/kg)	6,79 \pm 2,15
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,085 \pm 0,020
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,083 \pm 0,010
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,122 \pm 0,013
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	6,11 \pm 1,06
F (%)	71,60 \pm 12,36
MRT (h)	18,88 \pm 1,61
CL (L/h/kg)	2,34 \pm 0,01
C _{max} (μg/mL)	0,385 \pm 0,051
T _{max} (h)	3,39 \pm 0,41

Tabla 16. Parámetros cinéticos medios de ciflutrin tras dosis única IV y oral

Parámetro	Vía intravenosa (3 mg/kg p.c.)	Vía oral (20 mg/kg p.c.)
	Valor medio \pm D.S. (n = 8)	Valor medio \pm D.S. (n = 8)
A ₁ (μg/mL)	1,12 \pm 0,33	1,42 \pm 0,44
A ₂ (μg/mL)	0,057 \pm 0,005	0,168 \pm 0,039
A ₃ (μg/mL)	-	1,58 \pm 0,46
α (h ⁻¹)	6,73 \pm 2,32	0,249 \pm 0,034
β (h ⁻¹)	0,052 \pm 0,003	0,041 \pm 0,004
K _a (h ⁻¹)	-	0,448 \pm 0,071
t _{1/2α} (h)	0,122 \pm 0,064	2,85 \pm 0,51***
t _{1/2β} (h)	13,46 \pm 0,93	17,15 \pm 1,67***
t _{1/2a} (h)	-	1,58 \pm 0,23
V ₁ (L/kg)	2,41 \pm 0,84	9,62 \pm 3,09
V ₂ (L/kg)	36,84 \pm 4,54	6,79 \pm 2,15
V _{d(ss)} (L/kg)	39,65 \pm 3,62	-
K ₁₂ (h ⁻¹)	5,49 \pm 2,05	0,085 \pm 0,020
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,365 \pm 0,022	0,083 \pm 0,010
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,923 \pm 0,261	0,122 \pm 0,013
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	1,28 \pm 0,08	6,11 \pm 1,06
F (%)	-	71,60 \pm 12,36
MRT (h)	16,87 \pm 1,33	18,88 \pm 1,61*
CL (L/h/kg)	2,36 \pm 0,14	2,34 \pm 0,01
C _{max} (μg/mL)	-	0,385 \pm 0,051
T _{max} (h)	-	3,39 \pm 0,41

Parámetros toxicocinéticos plasmáticos de ciflutrin tras la administración IV y oral

* $P < 0.05$ y *** $P < 0,001$.

5.2. TOXICOCINÉTICA DE CIFLUTRIN EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL

Los niveles tisulares de ciflutrin encontrados en los tejidos nerviosos estudiados hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal de ciflutrin, tras la administración de ciflutrin a dosis única oral de 20 mg/kg p.c. se muestran en las Tablas 17-20 y en las Figuras 11 y 12.

La Figura 11 recoge los niveles tisulares de ciflutrin observados tras la administración oral de 20 mg/kg p.c. en las regiones cerebrales (hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal) estudiadas, mientras que la Figura 12 muestra los niveles tisulares y plasmáticos de ciflutrin tras administración oral de 20 mg/kg p.c.

Las Tablas 21-25 recogen los parámetros cinéticos de ciflutrin calculados en los tejidos nerviosos estudiados tras administración oral de dosis única de ciflutrin de 20 mg/kg. Tras administración oral de ciflutrin se encuentra el mayor C_{\max} en hipotálamo, seguido por cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal. Tras administración oral de ciflutrin el tejido nervioso donde se encuentra la mayor razón $AUC_{(0-24) \text{ tejido}} / AUC_{(0-24) \text{ plasma}}$ fue en el hipotálamo (Tabla 25). Las semividas de eliminación alcanzan un rango entre 15-24 h tras administración oral en los tejidos nerviosos estudiados (Tabla 25).

Tabla 17. Niveles de ciflutrin en **hipotálamo** ($\mu\text{g/g}$) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis oral (h)	Hipotálamo ($\mu\text{g/g}$)								
	8 grupo de animales (10 animales/grupo)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,056	0,048	0,046	0,057	0,071	0,061	0,069	0,052	$0,058 \pm 0,009$
0,33	0,100	0,110	0,120	0,132	0,190	0,200	0,140	0,098	$0,136 \pm 0,039$
0,5	0,300	0,300	0,280	0,306	0,310	0,350	0,280	0,290	$0,302 \pm 0,022$
1	0,830	0,840	0,710	0,740	0,720	0,750	0,780	0,620	$0,749 \pm 0,071$
2	0,970	1,120	1,01	1,06	1,11	1,13	1,18	0,950	$1,07 \pm 0,08$
4	1,86	1,83	1,85	1,82	1,80	1,82	1,90	1,69	$1,82 \pm 0,06$
6	1,56	1,51	1,22	1,23	1,16	1,19	1,15	1,21	$1,28 \pm 0,16$
8	1,06	0,990	0,850	0,850	0,800	0,820	0,720	0,780	$0,859 \pm 0,112$
12	0,500	0,400	0,350	0,350	0,280	0,290	0,280	0,250	$0,338 \pm 0,082$
24	0,230	0,170	0,220	0,206	0,130	0,180	0,165	0,110	$0,150 \pm 0,042$

Tabla 18. Niveles de ciflutrin en **cuerpo estriado** ($\mu\text{g/g}$) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis oral (h)	Cuerpo estriado ($\mu\text{g/g}$)								
	8 grupo de animales (10 animales/grupo)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,042	0,039	0,040	0,044	0,041	0,043	0,040	0,038	0,041 \pm 0,002
0,33	0,065	0,055	0,058	0,067	0,061	0,060	0,056	0,055	0,060 \pm 0,005
0,5	0,085	0,095	0,097	0,086	0,091	0,093	0,098	0,087	0,091 \pm 0,005
1	0,190	0,160	0,190	0,200	0,185	0,183	0,167	0,170	0,181 \pm 0,014
2	0,320	0,340	0,360	0,340	0,340	0,337	0,346	0,344	0,341 \pm 0,011
4	0,640	0,700	0,730	0,590	0,665	0,669	0,690	0,700	0,673 \pm 0,043
6	0,450	0,490	0,500	0,410	0,463	0,460	0,510	0,507	0,474 \pm 0,034
8	0,360	0,260	0,280	0,220	0,280	0,278	0,270	0,273	0,278 \pm 0,039
12	0,180	0,170	0,180	0,130	0,165	0,163	0,180	0,177	0,168 \pm 0,017
24	0,101	0,120	0,140	0,091	0,130	0,096	0,126	0,127	0,116 \pm 0,018

Tabla 19. Niveles de ciflutrin en **hipocampo** ($\mu\text{g/g}$) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis oral (h)	Hipocampo ($\mu\text{g/g}$)								
	8 grupo de animales (10 animales/grupo)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,031	0,032	0,030	0,031	0,029	0,032	0,033	0,032	$0,031 \pm 0,001$
0,33	0,052	0,056	0,053	0,053	0,049	0,054	0,055	0,054	$0,053 \pm 0,002$
0,5	0,120	0,118	0,125	0,121	0,114	0,124	0,126	0,127	$0,122 \pm 0,004$
1	0,240	0,250	0,239	0,241	0,228	0,247	0,252	0,250	$0,243 \pm 0,008$
2	0,340	0,370	0,365	0,353	0,323	0,350	0,357	0,360	$0,352 \pm 0,015$
4	0,540	0,580	0,559	0,561	0,513	0,556	0,567	0,569	$0,556 \pm 0,021$
6	0,400	0,430	0,421	0,412	0,380	0,412	0,420	0,415	$0,411 \pm 0,015$
8	0,290	0,300	0,298	0,299	0,276	0,299	0,305	0,303	$0,296 \pm 0,009$
12	0,162	0,164	0,168	0,163	0,154	0,167	0,170	0,160	$0,164 \pm 0,005$
24	0,103	0,098	0,107	0,105	0,098	0,106	0,110	0,105	$0,104 \pm 0,004$

Tabla 20. Niveles de ciflutrin en **corteza frontal** ($\mu\text{g/g}$) tras administración de dosis oral única de 20 mg/kg p.c.

Tiempo tras dosis oral (h)	Corteza frontal ($\mu\text{g/g}$)								
	8 grupo de animales (10 animales/grupo)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio \pm D.S. (n=8)
0,16	0,039	0,037	0,038	0,042	0,039	0,041	0,040	0,041	0,040 \pm 0,002
0,33	0,062	0,052	0,055	0,064	0,058	0,057	0,059	0,058	0,058 \pm 0,004
0,5	0,081	0,090	0,091	0,082	0,086	0,088	0,084	0,086	0,086 \pm 0,004
1	0,181	0,152	0,181	0,190	0,171	0,174	0,175	0,175	0,175 \pm 0,011
2	0,304	0,323	0,342	0,323	0,323	0,329	0,322	0,324	0,324 \pm 0,010
4	0,608	0,665	0,607	0,561	0,613	0,620	0,618	0,613	0,613 \pm 0,028
6	0,428	0,466	0,475	0,390	0,428	0,443	0,438	0,438	0,438 \pm 0,026
8	0,342	0,247	0,277	0,209	0,228	0,241	0,257	0,255	0,257 \pm 0,040
12	0,180	0,162	0,188	0,124	0,151	0,166	0,155	0,160	0,161 \pm 0,019
24	0,077	0,114	0,099	0,086	0,097	0,093	0,099	0,094	0,095 \pm 0,011

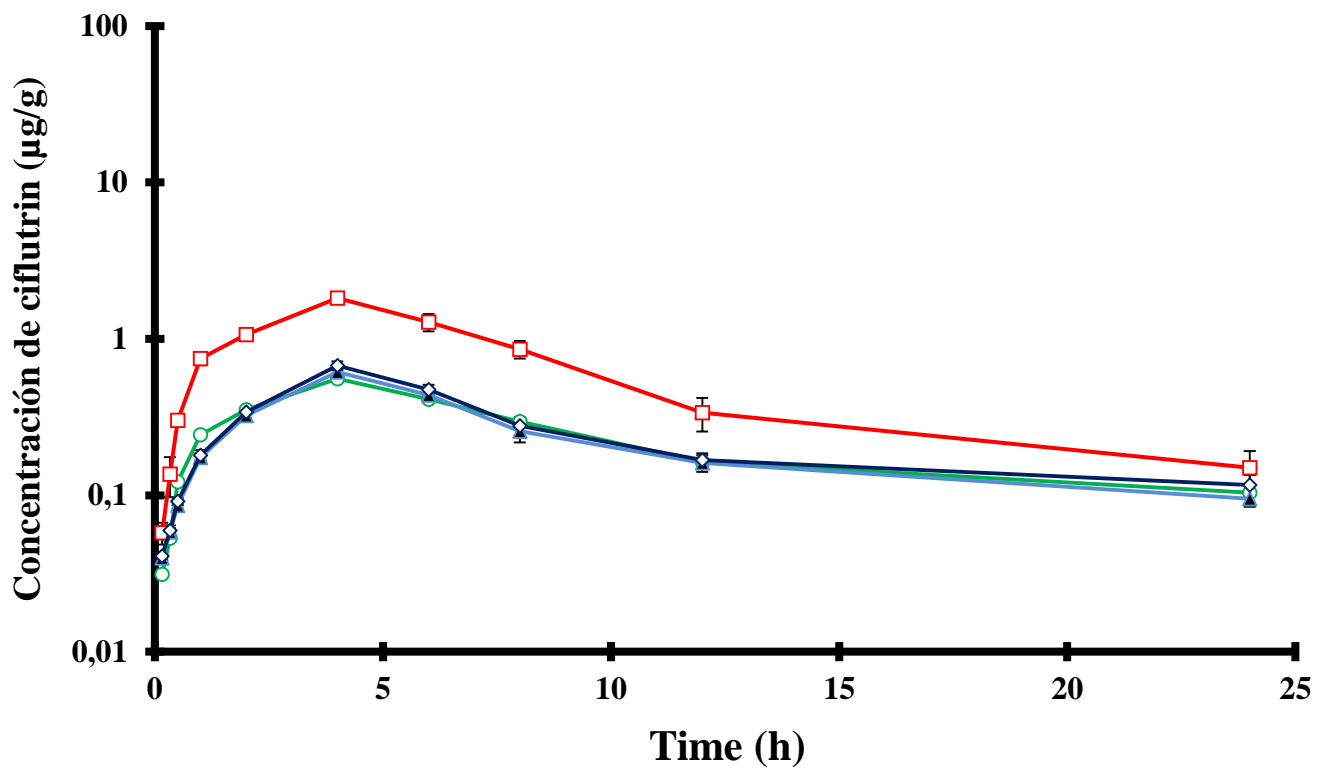


Figura 11. Niveles medios de ceflutrin en regiones cerebrales (hipotálamo □; cuerpo estriado ◇; hipocampo o; corteza frontal ▲) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Cada valor representa la media de 8 ratas. La D.S. está indicado por las barras, los símbolos sin barras indican que la D.S. está dentro de los símbolos.

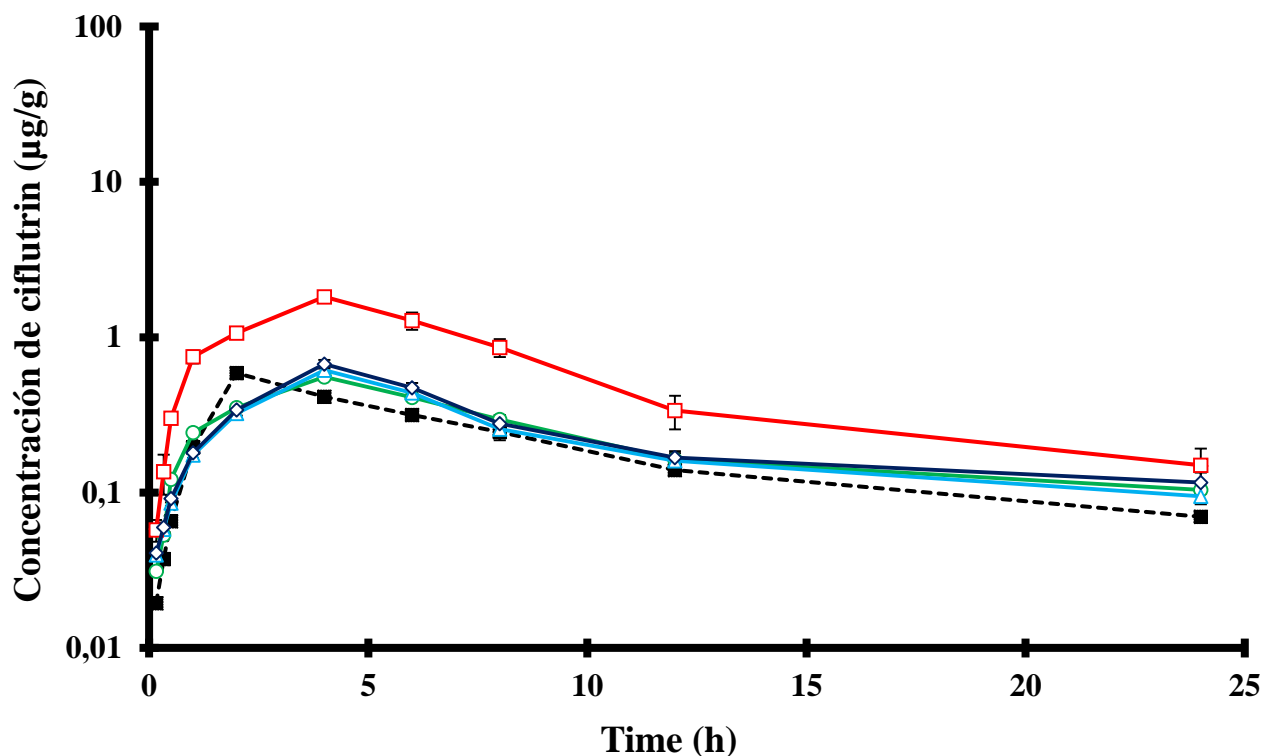


Figura 12. Niveles medios de ceflutrin en plasma (-■-) y regiones cerebrales (hipotálamo □; cuerpo estriado ◇; hipocampo o; corteza frontal ▲) tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Cada valor representa la media de 8 ratas. La D.S. está indicado por las barras, los símbolos sin barras indican que la D.S. está dentro de los símbolos.

Tabla 21. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles de ciflutrin en **hipotálamo** *versus* tiempo en 8 grupos (I-O) de animales (10 animales/grupo)

Parámetro	8 grupos de animales (I-O)								Valor medio ± D.S. (n=8)
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	
A ₁ (µg/mL)	5,85	3,05	4,45	5,20	7,15	7,56	7,62	6,01	5,86 ± 1,60
A ₂ (µg/mL)	0,360	0,126	0,394	0,329	0,215	0,287	0,283	0,176	0,271 ± 0,093
A ₃ (µg/mL)	6,21	3,18	4,84	5,53	7,37	7,85	7,90	6,19	6,13 ± 1,62
α (h ⁻¹)	0,183	0,132	0,196	0,200	0,218	0,232	0,247	0,210	0,202 ± 0,035
β (h ⁻¹)	0,034	0,033	0,031	0,028	0,032	0,028	0,030	0,029	0,031 ± 0,002
K _a (h ⁻¹)	0,318	0,399	0,355	0,336	0,327	0,338	0,361	0,318	0,344 ± 0,027
t _{1/2α} (h)	3,79	5,24	3,53	3,46	3,18	2,99	2,80	3,30	3,54 ± 0,76
t _{1/2β} (h)	20,36	21,20	22,06	24,45	21,93	24,86	23,13	23,83	22,73 ± 1,60
t _{1/2a} (h)	2,18	1,74	1,95	2,07	2,12	2,05	1,92	2,18	2,026 ± 0,150
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,044	0,013	0,062	0,065	0,053	0,078	0,081	0,052	0,056 ± 0,022
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,051	0,038	0,057	0,050	0,046	0,048	0,051	0,042	0,048 ± 0,006
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,12	0,114	0,109	0,114	0,151	0,134	0,145	0,145	0,129 ± 0,017
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	23,02	18,96	21,60	21,09	17,04	19,68	18,34	15,15	19,36 ± 2,56
MRT (h)	18,45	14,28	22,57	23,74	17,11	22,25	20,65	18,77	19,73 ± 3,17
C _{max} (µg/mL)	1,39	1,26	1,21	1,18	1,18	1,22	1,23	1,01	1,21 ± 0,11
T _{max} (h)	4,38	4,24	4,09	4,13	3,91	3,81	3,56	4,03	4,02 ± 0,26

Tabla 22. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles de ciflutrin en **cuerpo estriado** *versus* tiempo en 8 grupos (I-O) de animales (10 animales/grupo).

Parámetro	8 grupos de animales (I-O)								Valor medio ± D.S. (n=8)
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	
A ₁ (µg/mL)	1,98	1,53	1,72	1,66	1,48	2,18	1,33	1,33	1,65 ± 0,30
A ₂ (µg/mL)	0,186	0,239	0,287	0,179	0,275	0,191	0,245	0,292	0,237 ± 0,046
A ₃ (µg/mL)	2,17	1,77	2,01	1,84	1,76	2,37	1,58	1,62	1,89 ± 0,27
α (h ⁻¹)	0,184	0,174	0,171	0,217	0,181	0,202	0,170	0,167	0,183 ± 0,018
β (h ⁻¹)	0,037	0,036	0,037	0,036	0,038	0,039	0,036	0,043	0,038 ± 0,002
K _a (h ⁻¹)	0,286	0,302	0,282	0,348	0,305	0,299	0,32	0,296	0,305 ± 0,021
t _{1/2α} (h)	3,77	3,99	4,05	3,19	3,84	3,43	4,07	4,14	3,81 ± 0,34
t _{1/2β} (h)	18,69	19,15	18,98	19,41	18,27	17,71	19,40	16,26	18,48 ± 1,07
t _{1/2a} (h)	2,43	2,30	2,45	1,99	2,27	2,31	2,17	2,34	2,28 ± 0,15
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,051	0,050	0,049	0,074	0,053	0,058	0,049	0,041	0,053 ± 0,010
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,064	0,070	0,073	0,073	0,078	0,070	0,071	0,080	0,072 ± 0,005
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,106	0,090	0,086	0,106	0,087	0,113	0,086	0,089	0,095 ± 0,011
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	8,21	9,57	10,80	7,37	9,69	7,76	9,73	9,33	9,06 ± 1,16
MRT (h)	20,44	22,52	22,52	21,46	22,36	19,65	22,57	20,06	21,45 ± 1,23
C _{max} (µg/mL)	0,426	0,451	0,482	0,395	0,446	0,423	0,454	0,444	0,440 ± 0,026
T _{max} (h)	4,84	4,96	5,26	4,10	4,96	4,54	4,87	5,19	4,84 ± 0,37

Tabla 23. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles de ciflutrin en **hipocampo** *versus* tiempo en 8 grupos (I-O) de animales (10 animales/grupo).

Parámetro	8 grupos de animales (I-O)								Valor medio ± D.S. (n=8)
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	
A ₁ (µg/mL)	1,37	1,33	1,21	1,81	1,29	1,47	1,54	1,86	1,49 ± 0,24
A ₂ (µg/mL)	0,216	0,254	0,251	0,175	0,206	0,213	0,21	0,173	0,21 ± 0,030
A ₃ (µg/mL)	1,59	1,58	1,46	1,99	1,50	1,68	1,75	2,03	1,70 ± 0,21
α (h ⁻¹)	0,208	0,204	0,201	0,209	0,207	0,208	0,209	0,215	0,21 ± 0,004
β (h ⁻¹)	0,038	0,046	0,041	0,03	0,038	0,036	0,034	0,029	0,04 ± 0,006
K _a (h ⁻¹)	0,351	0,355	0,361	0,328	0,35	0,347	0,346	0,335	0,350 ± 0,011
t _{1/2α} (h)	3,33	3,39	3,44	3,31	3,34	3,33	3,32	3,23	3,34 ± 0,06
t _{1/2β} (h)	18,32	15,12	16,86	22,89	18,22	19,03	20,16	23,86	19,31 ± 2,93
t _{1/2a} (h)	1,97	1,95	1,92	2,12	1,98	1,99	2,00	2,07	2,00 ± 0,07
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,068	0,056	0,06	0,077	0,067	0,069	0,073	0,082	0,07 ± 0,008
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,082	0,091	0,088	0,065	0,082	0,078	0,076	0,065	0,08 ± 0,010
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,096	0,103	0,094	0,097	0,096	0,097	0,095	0,097	0,10 ± 0,003
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	7,77	7,58	8,05	8,35	7,38	8,08	8,43	8,56	8,03 ± 0,42
MRT (h)	21,67	18,39	20,88	26,04	21,76	22,82	24,00	26,62	22,77 ± 2,72
C _{max} (µg/mL)	0,393	0,416	0,408	0,403	0,373	0,406	0,413	0,41	0,40 ± 0,014
T _{max} (h)	4,28	4,29	4,33	4,31	4,29	4,28	4,28	4,21	4,28 ± 0,03

Tabla 24. Parámetros cinéticos de ciflutrin tras administración de dosis única de 20 mg/kg p.c. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de los niveles de ciflutrin en **corteza frontal** *versus* tiempo en 8 grupos (I-O) de animales (10 animales/grupo)

Parámetro	8 grupos de animales (I-O)								
	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	Valor medio ± D.S. (n=8)
A ₁ (µg/mL)	2,84	1,45	2,14	1,55	1,40	1,97	1,95	1,97	1,91 ± 0,47
A ₂ (µg/mL)	0,096	0,227	0,167	0,173	0,213	0,165	0,171	0,167	0,172 ± 0,039
A ₃ (µg/mL)	2,94	1,68	2,31	1,72	1,61	2,14	2,12	2,14	2,08 ± 0,43
α (h ⁻¹)	0,186	0,174	0,188	0,216	0,201	0,200	0,203	0,203	0,196 ± 0,013
β (h ⁻¹)	0,033	0,036	0,034	0,037	0,039	0,035	0,032	0,034	0,035 ± 0,002
K _a (h ⁻¹)	0,262	0,302	0,285	0,349	0,338	0,307	0,306	0,306	0,307 ± 0,027
t _{1/2α} (h)	3,73	3,99	3,68	3,22	3,46	3,46	3,41	3,42	3,55 ± 0,24
t _{1/2β} (h)	21,07	19,19	20,41	18,87	17,56	19,80	21,45	20,19	19,82 ± 1,26
t _{1/2a} (h)	2,65	2,29	2,43	1,98	2,05	2,26	2,27	2,26	2,27 ± 0,21
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,042	0,05	0,056	0,071	0,061	0,062	0,069	0,065	0,060 ± 0,010
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,047	0,070	0,060	0,074	0,079	0,064	0,065	0,065	0,066 ± 0,010
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,130	0,090	0,107	0,107	0,100	0,109	0,102	0,107	0,107 ± 0,011
AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)	6,97	9,09	8,20	6,96	7,62	7,60	7,97	7,60	7,75 ± 0,69
MRT (h)	18,28	22,51	21,53	20,90	21,08	21,22	24,05	22,29	21,48 ± 1,65
C _{max} (µg/mL)	0,409	0,429	0,423	0,377	0,395	0,404	0,395	0,400	0,404 ± 0,017
T _{max} (h)	4,79	4,95	4,76	4,11	4,39	4,480	4,51	4,48	4,56 ± 0,27

Tabla 25. Parámetros toxicocinéticos de ciflutrin en regiones cerebrales tras administración de dosis única oral de 20 mg/kg p.c.

Región Cerebral	C _{max} (µg/g)	T _{max} (h)	t _{1/2} β (h)	AUC ₍₀₋₂₄₎ (mg h/L)
	Valor medio ± D.S. (n = 8)	Valor medio ± D.S. (n = 8)	Valor medio ± D.S. (n = 8)	Valor medio ± D.S. (n = 8)
Hipotálamo	1.21 ± 0.11***	4.02 ± 0.26**	22.73 ± 1.60***	19.36 ± 2.56***
Cuerpo Estriado	0.440 ± 0.026*	4.84 ± 0.37***	18.48 ± 1.07	9.06 ± 1.16***
Hipocampo	0.400 ± 0.014	4.28 ± 0.03***	19.31 ± 2.93	8.03 ± 0.42***
Corteza Frontal	0.404 ± 0.017	4.56 ± 0.27***	19.82 ± 1.26**	7.75 ± 0.69**
Plasma	0.385 ± 0.051	3.39 ± 0.41	17.15 ± 1.67	6.11 ± 1.06

Parámetros toxicocinéticos de las regiones cerebrales fueron significativamente mayores que los parámetros plasmáticos

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ (prueba de T-student)

5.3. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA, DOPAMINA Y METABOLITOS EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se evaluó los efectos del piretroide ciflutrin tras administración oral (1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c./día durante 6 días) sobre los niveles de monoaminas en tejidos del SNC de ratas Wistar macho. En ratas tratadas con ciflutrin a dosis de 1, 5 y 10 mg/kg p.c./día durante 6 días, no se observaron signos clínicos adversos. Sin embargo, en ratas tratadas con ciflutrin a la dosis más alta (20 mg/kg p.c./día durante 6 días) se observó contracción muscular con leve incoordinación del movimiento en las extremidades posteriores, sin discinecia ni tremor 1-2 h después de la administración de ciflutrin. Los signos fueron reversibles a 6 h después de la administración. A las 24 h después de la última administración de ciflutrin se determinaron los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos en tejidos del SNC hipotálamo, corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y mesencéfalo por HPLC con detección electroquímica.

Por otra parte, las ratas tratadas con ciflutrin no presentaron efectos o cambios estadísticamente significativos en el peso corporal, ganancia de peso, y consumo de alimento y agua durante el periodo del tratamiento, en comparación del grupo control.

5.3.1. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE SEROTONINA Y METABOLITO ÁCIDO 5-HIDROXI-3-INDOLACÉTICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La administración de ciflutrin a dosis oral de 1 mg/kg p.c. no alteró los niveles de 5-HT y 5-HIAA en las regiones cerebrales estudiadas. Por lo que esta dosis en el

presente estudio, corresponde con el NOAEL (punto crítico para la alteración del neurotransmisor 5-HT)

Ciflutrin administrado a dosis oral de 5, 10 y 20 mg/kg p.c. durante 6 días, produjo de forma dosis-dependiente una disminución estadísticamente significativa de los niveles de **5-HT** en todas las regiones cerebrales estudiadas en comparación con el respectivo grupo control ($P < 0,05$). Además, la prueba de comparación múltiple de Duncan mostró que ciflutrin (5, 10 y 20 mg/kg p.c.) produjo una disminución estadísticamente significativa del contenido de 5-HT en el hipotálamo (-28%, -34% y -36%, respectivamente) y corteza frontal (-37%, -42% y -45%, respectivamente) respecto del grupo control. Por otra parte, ciflutrin a dosis de 10 y 20 mg/kg p.c. produjo una disminución significativa de 5-HT en hipocampo (-37% y -52%, respectivamente) y sólo a dosis de 20 mg/kg p.c. en mesencéfalo (-39%) y en cuerpo estriado (-48%), respecto del grupo control. Los niveles de **5-HIAA**, a la dosis más alta de ciflutrin (20 mg/kg p.c.), disminuyeron de forma estadísticamente significativa ($P < 0.001$) en hipocampo (-36%) e hipotálamo (-24%), en comparación al grupo control. Además, ciflutrin a dosis de 20 mg/kg p.c. produjo un incremento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) de la tasa de recambio (**5-HIAA/5HT**) con respecto al grupo control en mesencéfalo (62%) y cuerpo estriado (90%) (Tablas 26-30, Figura 13). La Tabla 31 y la Figura 13 recogen de forma sumariada el efecto del piretroide ciflutrin sobre los niveles de 5-HT, 5-HIAA y la tasa de recambio (**5-HIAA/5HT**) en las regiones cerebrales estudiadas.

Tabla 26. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en **hipotálamo**.

	HIPOTÁLAMO		
	5 – HT (ng/g)	5 – HIAA (ng/g)	5 – HIAA/5 - HT
Grupo Control	1589,28 ± 111,25	755,16 ± 37,76	0,49 ± 0,03
Grupo I 1 mg/kg p.c.	1557,49 ± 95,36	747,61 ± 30,20	0,48 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	1154,80 ± 96,23 (- 28 %) **	642,74 ± 52,93	0,56 ± 0,03
Grupo III 10 mg/kg p.c.	1052,40 ± 143,50 (- 34 %) **	628,00 ± 37,38	0,60 ± 0,10
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	1029,20 ± 176,89 (- 36 %) ***	577,60 ± 53,20 (- 24 %) *	0,57 ± 0,13

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba post-hoc de Duncan).

Tabla 27. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en **corteza frontal**.

	CORTEZA FRONTAL		
	5 – HT (ng/g)	5 – HIAA (ng/g)	5 – HIAA/5 - HT
Grupo Control	648,00 ± 19,44	209,70 ± 16,78	0,32 ± 0,03
Grupo I 1 mg/kg p.c.	667,44 ± 16,85	203,41 ± 12,58	0,33 ± 0,01
Grupo II 5 mg/kg p.c.	409,61 ± 78,02 (- 37 %)*	191,50 ± 27,36	0,45 ± 0,13
Grupo III 10 mg/kg p.c.	387,20 ± 6,68 (- 42 %)**	194,40 ± 20,83	0,45 ± 0,04
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	351,20 ± 31,93 (- 45 %)**	167,60 ± 50,91	0,38 ± 0,08

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (ANOVA con la prueba post-hoc de Duncan).

Tabla 28. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en **cuerpo estriado**.

	CUERPO ESTRIADO		
	5 – HT (ng/g)	5 – HIAA (ng/g)	5 – HIAA/5 - HT
Grupo Control	684,76 ± 19,49	486,97 ± 24,35	0,80 ± 0,05
Grupo I 1 mg/kg p.c.	671,06 ± 20,54	482,10 ± 19,48	0,80 ± 0,04
Grupo II 5 mg/kg p.c.	661,53 ± 54,56	467,60 ± 9,74	1,10 ± 0,11
Grupo III 10 mg/kg p.c.	630,60 ± 47,98	434,40 ± 9,76	1,09 ± 0,10
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	357,08 ± 13,73 (- 48 %)**	390,77 ± 67,16	1,49 ± 0,16 (90 %)***

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba post-hoc de Duncan).

Tabla 29. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en **hipocampo**.

	HIPOCAMPO		
	5 – HT (ng/g)	5 – HIAA (ng/g)	5 – HIAA/5 - HT
Grupo Control	266,70 ± 13,39	193,20 ± 3,86	0,77 ± 0,03
Grupo I 1 mg/kg p.c.	272,03 ± 13,33	189,34 ± 1,93	0,77 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	216,34 ± 26,71	176,80 ± 13,45	0,84 ± 0,11
Grupo III 10 mg/kg p.c.	166,84 ± 23,83 (- 37 %)**	153,76 ± 17,30	0,97 ± 0,09
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	127,28 ± 26,52 (- 52 %)**	124,16 ± 26,74 (- 36 %)**	1,00 ± 0,27

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba post-hoc de Duncan).

Tabla 30. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en **mesencéfalo**.

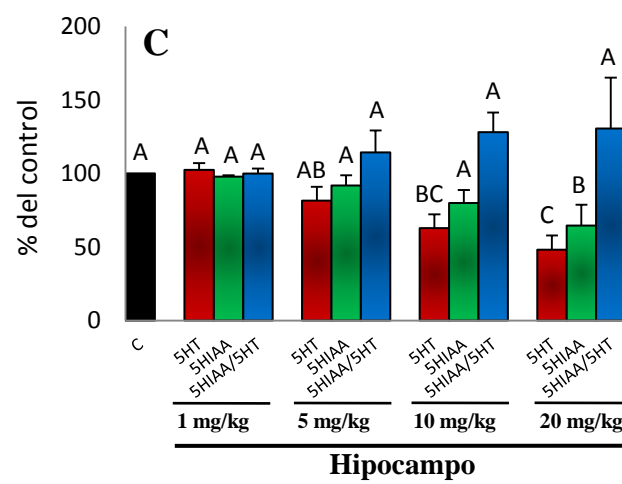
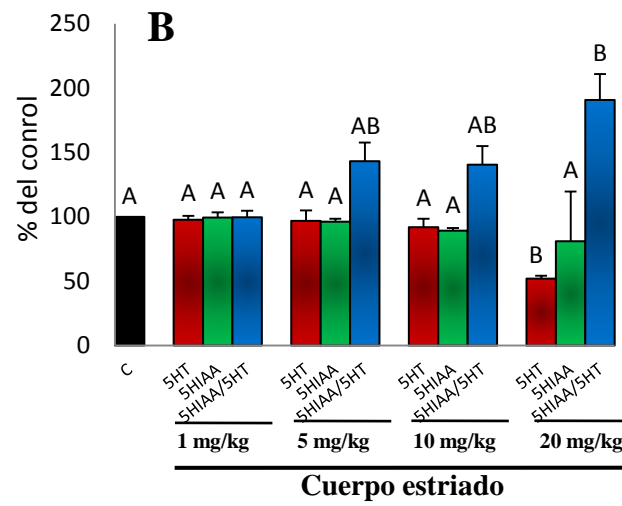
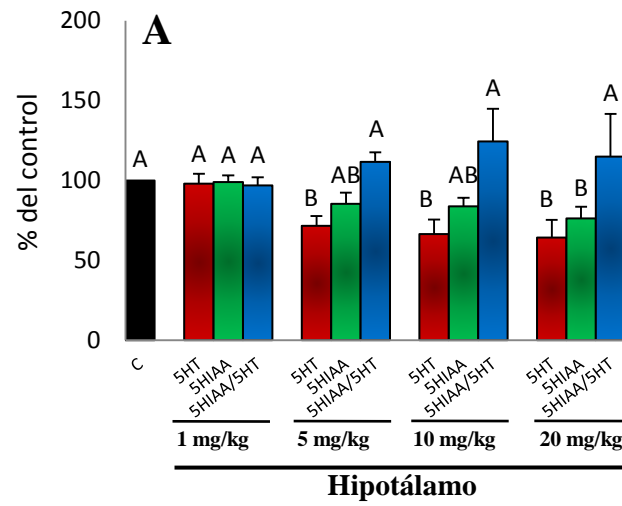
	MESENCÉFALO		
	5 – HT (ng/g)	5 – HIAA (ng/g)	5 – HIAA/5 - HT
Grupo Control	1572,30 ± 47,26	682,20 ± 13,64	0,45 ± 0,01
Grupo I 1 mg/kg p.c.	1588,02 ± 31,45	668,56 ± 6,82	0,44 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	1506,60 ± 125,55	642,60 ± 170,90	0,46 ± 0,08
Grupo III 10 mg/kg p.c.	1376,10 ± 173,99	643,50 ± 177,98	0,54 ± 0,07
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	945,00 ± 77,46 (-39 %)**	605,15 ± 129,19	0,70 ± 0,04 (62 %)***

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 31. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT, de su metabolito 5-HIAA y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en las regiones cerebrales estudiadas.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Hipotálamo	Mesencéfalo
Grupo Control					
5-HT	648,00 ± 19,44	266,70 ± 13,39	684,76 ± 19,49	1589,28 ± 111,25	1572,30 ± 47,26
5-HIAA	209,70 ± 16,78	193,20 ± 3,86	486,97 ± 24,35	755,16 ± 37,76	682,20 ± 13,64
5-HIAA/5-HT	0,32 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,80 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,45 ± 0,01
Grupo I - 1 mg/kg p.c.					
5-HT	667,44 ± 16,85	272,03 ± 13,33	671,06 ± 20,54	1557,49 ± 95,36	1588,02 ± 31,45
5-HIAA	203,41 ± 12,58	189,34 ± 1,93	482,10 ± 19,48	747,61 ± 30,20	668,56 ± 6,82
5-HIAA/5-HT	0,33 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,80 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,44 ± 0,02
Grupo II - 5 mg/kg p.c.					
5-HT	409,61 ± 78,02 (- 37 %)*	216,34 ± 26,71	661,53 ± 54,56	1154,80 ± 96,23 (- 28 %)**	1506,60 ± 125,55
5-HIAA	191,50 ± 27,36	176,80 ± 13,45	467,60 ± 9,74	642,74 ± 52,93	642,60 ± 170,90
5-HIAA/5-HT	0,45 ± 0,13	0,84 ± 0,11	1,10 ± 0,11	0,56 ± 0,03	0,46 ± 0,08
Grupo III - 10 mg/kg p.c.					
5-HT	387,20 ± 6,68 (- 42 %)**	166,84 ± 23,83 (- 37 %)**	630,60 ± 47,98	1052,40 ± 143,50 (- 34 %)**	1376,10 ± 173,99
5-HIAA	194,40 ± 20,83	153,76 ± 17,30	434,40 ± 9,76	628,00 ± 37,38	643,50 ± 177,98
5-HIAA/5-HT	0,45 ± 0,04	0,97 ± 0,09	1,09 ± 0,10	0,60 ± 0,10	0,54 ± 0,07
Grupo IV - 20 mg/kg p.c.					
5-HT	351,20 ± 31,93 (- 45 %)**	127,28 ± 26,52 (- 52 %)**	357,08 ± 13,73 (- 48 %)**	1029,20 ± 176,89 (- 36 %)**	945,00 ± 77,46 (- 39 %)**
5-HIAA	167,60 ± 50,91	124,16 ± 26,74 (- 36 %)**	390,77 ± 67,16	577,60 ± 53,20 (- 24 %)*	605,15 ± 129,19
5-HIAA/5-HT	0,38 ± 0,08	1,00 ± 0,27	1,49 ± 0,16 (90 %)**	0,57 ± 0,13	0,70 ± 0,04 (62 %)**

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).



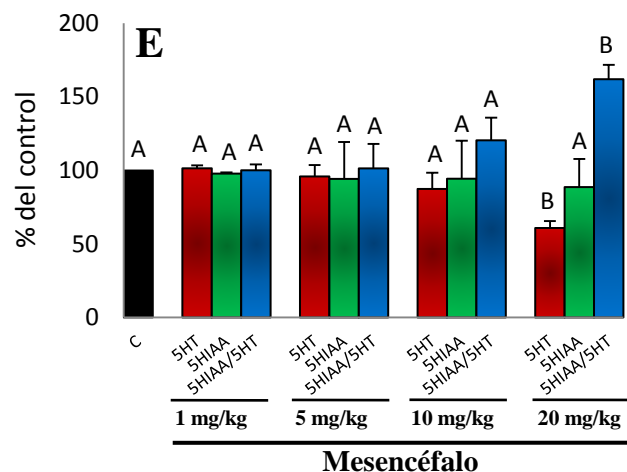
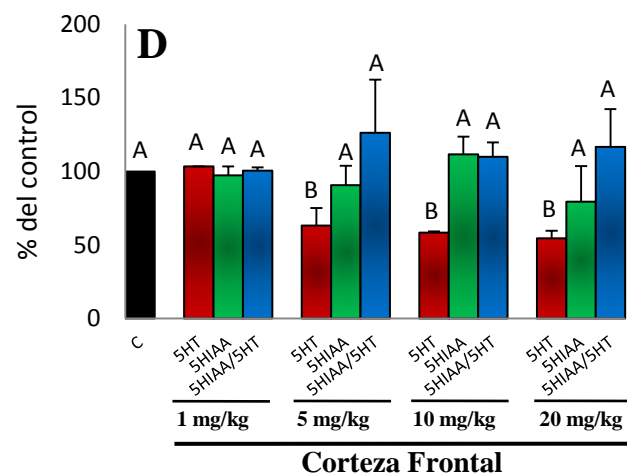


Figura 13. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de 5-HT (■), de su metabolito 5-HIAA (■) y de la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT, ■) en regiones cerebrales de ratas machos (A, B, C, D, E).

Los datos se expresan como los valores medios \pm D.S. y como porcentajes respecto del control (■), $n=5$. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

5.3.2. EFECTO DE CIFLUTRIN SOBRE LOS NIVELES DE DOPAMINA Y METABOLITOS ÁCIDO 3,4-DIHIIDROXIFENILACÉTICO Y ÁCIDO HOMOVANÍLICO EN TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La administración de ciflutrin a dosis oral de 1 mg/kg p.c. no afectó los niveles de DA, DOPAC y HVA en las regiones cerebrales estudiadas. Por lo que ésta dosis en el presente estudio, corresponde con el NOAEL (punto crítico para la alteración del neurotransmisor DA). El piretroide ciflutrin administrado a dosis oral de 5, 10 y 20 mg/kg p.c., de forma dosis- dependiente, produjo una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,001$) de los niveles de **DA** en todas las regiones cerebrales estudiadas en comparación con el respectivo grupo control. Además, la prueba de comparación múltiple de Duncan demuestra que ciflutrin (5, 10 y 20 mg/kg p.c.) produjo una disminución estadísticamente significativa del contenido de DA en el hipotálamo (-36%, -49% y -69%, respectivamente), hipocampo (-45%, -53% y -53%, respectivamente), corteza frontal (-41%, -44% y -55%, respectivamente) y mesencéfalo (-35%, -75% y -77%, respectivamente), y a dosis de 10 y 20 mg/kg p.c. en cuerpo estriado (-67% y -81%, respectivamente) con respecto del grupo control (Tablas 32-37, Figura 14). Ciflutrin a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg p.c. disminuyó significativamente ($P < 0,001$), de forma dosis dependiente, los niveles del metabolito **DOPAC** en hipotálamo (-47%, -71% y -95%, respectivamente), mesencéfalo (-56%, -56% y -57%, respectivamente), hipocampo (-40%, -46% y -49%, respectivamente) y corteza frontal (-32%, -41% y -48%, respectivamente); mientras que los niveles de DOPAC sólo disminuyeron a dosis de 10 y 20 mg/kg p.c. en cuerpo estriado (-37% y -53%, respectivamente) con respecto al grupo control. Asimismo, los niveles de **HVA** también disminuyeron con respecto al grupo control a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg p.c. en hipotálamo (-72%, -79% y -78%, respectivamente), a dosis de 10 y 20 mg/kg p.c. en

mesencéfalo (-34% y -60%, respectivamente) e hipocampo (-35% and -60%, respectivamente); y a dosis de 20 mg/kg p.c. en corteza frontal (-75%) y cuerpo estriado (-26%) respecto del grupo control. Además, el piretroide ciflutrin a dosis de 20 mg/kg p.c. produjo un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.001$) de la tasa de recambio (**DOPAC+HVA/DA**) comparado con su respectivo grupo control en cuerpo estriado (72%) y corteza frontal (123%) (Tablas 32-37, Figura 14).

Tabla 32. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos (DOPAC y HVA) y la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en **hipotálamo**.

	HIPOTÁLAMO			
	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC + HVA) /DA
Grupo Control	503,20 ± 34,53	106,45 ± 4,39	45,34 ± 2,29	0,36 ± 0,02
Grupo I 1 mg/kg p.c.	513,26 ± 40,26	103,26 ± 2,13	44,89 ± 1,36	0,37 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	321,20 ± 25,09 (- 36 %) **	56,70 ± 7,35 (- 47 %) ***	13,20 ± 2,36 (- 72 %) ***	0,40 ± 0,04
Grupo III 10 mg/kg p.c.	255,20 ± 15,01 (- 49 %) ***	31,60 ± 3,27 (- 71 %) ***	9,62 ± 2,75 *** (- 79 %)	0,36 ± 0,05
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	156,60 ± 20,21 (- 69 %) ***	5,65 ± 1,13 (- 95 %) ***	10,19 ± 1,85 (- 78 %) ***	0,27 ± 0,03

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 33. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos (DOPAC y HVA) y tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en **corteza frontal**.

	CORTEZA FRONTAL			
	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC + HVA) /DA
Grupo Control	141,07 ± 4,23	25,71 ± 0,55	178,49 ± 2,56	1,95 ± 0,03
Grupo I 1 mg/kg p.c.	139,66 ± 2,82	26,22 ± 0,51	176,71 ± 1,78	1,97 ± 0,04
Grupo II 5 mg/kg p.c.	88,62 ± 10,51 (- 41 %)**	17,60 ± 1,96 (- 32 %)*	181,12 ± 3,45	2,25 ± 0,29
Grupo III 10 mg/kg p.c.	78,79 ± 16,88 (- 44 %)**	15,22 ± 2,58 (- 41%)**	172,20 ± 19,73	2,90 ± 0,56
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	63,60 ± 15,55 (- 55 %)***	13,60 ± 0,26 (- 48 %)**	46,38 ± 14,27 (- 75 %)***	4,30 ± 0,19

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n = 5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 34. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos (DOPAC y HVA) y tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en **cuerpo estriado**.

	CUERPO ESTRIADO			
	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC + HVA) /DA
Grupo Control	3319, 18 ± 33,19	751,4 ± 21,75	566,16 ± 5,66	1,03 ± 0,01
Grupo I 1 mg/kg p.c.	3352,37 ± 33,52	750,67 ± 22,52	567,40 ± 5,67	1,02 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	2715,50 ± 298,04	613,2 ± 37,85	548,65 ± 68,58	1,23 ± 0,19
Grupo III 10 mg/kg p.c.	1090,35 ± 165,20 (- 67 %)***	480,70 ± 112,66 (- 37 %)**	551,99 ± 56,91	1,50 ± 0,21
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	621,11 ± 163,45 (- 81 %)***	357,34 ± 96,78 (- 53 %)***	421,55 ± 89,93 (- 26 %)*	1,76 ± 0,17 (72 %)***

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 35. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos (DOPAC y HVA) y tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en **hipocampo**.

	HIPOCAMPO			
	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC + HVA) /DA
Grupo Control	144,54 ± 3,61	50,11 ± 1,50	27,83 ± 0,56	0,58 ± 0,02
Grupo I 1 mg/kg p.c.	141,65 ± 4,34	50,08 ± 1,00	27,81 ± 0,28	0,57 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	80,00 ± 13,09 (- 45 %)**	29,20 ± 8,27 (- 40 %)**	27,20 ± 4,58	0,64 ± 0,12
Grupo III 10 mg/kg p.c.	68,00 ± 23,15 (- 53 %)**	27,08 ± 5,01 (- 46%)**	18,45 ± 4,75 (- 35%)**	0,87 ± 0,14
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	67,59 ± 20,13 (- 53 %)**	25,18 ± 0,97 (- 49 %)**	10,40 ± 2,79 (- 60 %)**	0,53 ± 0,01

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 36. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos (DOPAC y HVA) y tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en **mesencéfalo**.

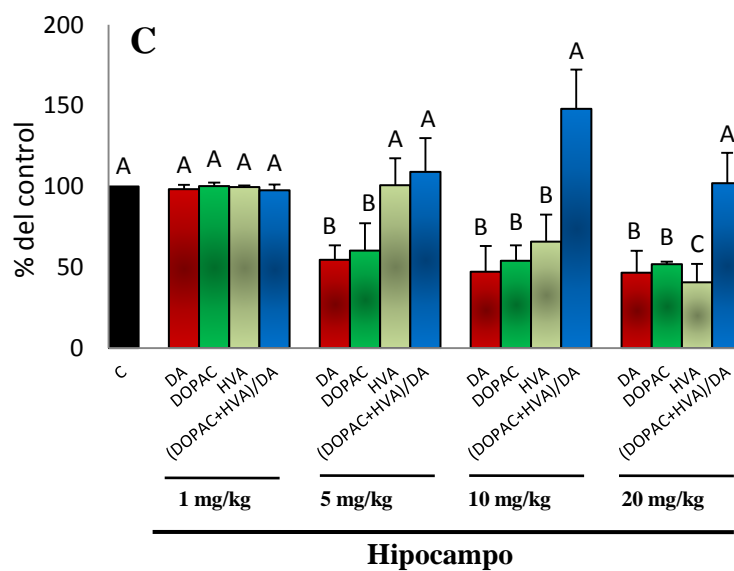
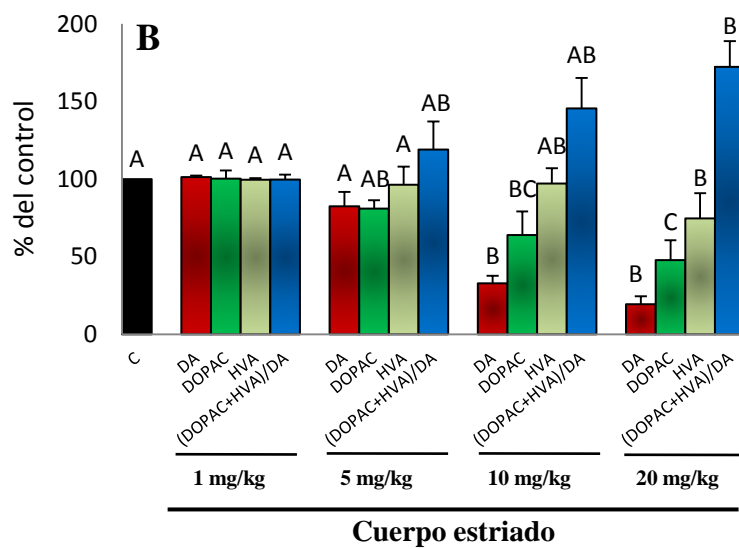
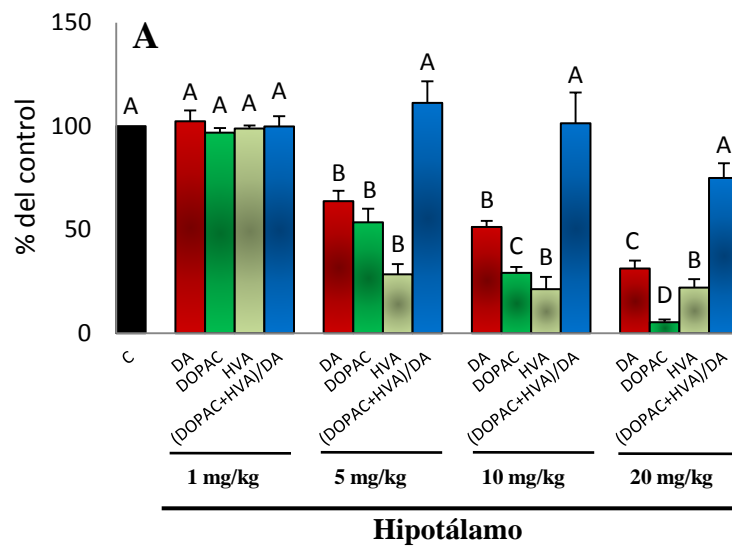
	MESENCÉFALO			
	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC + HVA) /DA
Grupo Control	470,13 ± 4,23	59,46 ± 1,55	110,34 ± 2,16	0,40 ± 0,03
Grupo I 1 mg/kg p.c.	465,43 ± 4,70	58,87 ± 1,19	109,24 ± 1,10	0,39 ± 0,02
Grupo II 5 mg/kg p.c.	304,50 ± 37,48 (- 35 %)**	26,54 ± 3,54 (- 56 %)**	111,16 ± 18,71	0,43 ± 0,08
Grupo III 10 mg/kg p.c.	127,00 ± 35,56 (- 75 %)**	23,00 ± 4,70 (- 56 %)**	67,40 ± 17,36 (- 34 %)**	0,67 ± 0,11
Grupo IV 20 mg/kg p.c.	118,43 ± 20,59 (- 77 %)**	25,65 ± 2,91 (- 57 %)**	43,37 ± 11,64 (- 60 %)**	0,62 ± 0,12

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

Tabla 37. Efecto del piretroide ciflutrin tras dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA, de sus metabolitos DOPAC y HVA y la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en las regiones cerebrales estudiadas.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Hipotálamo	Mesencéfalo
Grupo Control					
DA	141,07 ± 4,23	144,54 ± 3,61	3319,18 ± 33,19	503,20 ± 34,53	470,13 ± 4,23
DOPAC	25,71 ± 0,55	50,11 ± 1,50	751,4 ± 21,75	106,45 ± 4,39	59,46 ± 1,55
HVA	178,49 ± 2,56	27,83 ± 0,56	566,16 ± 5,66	45,34 ± 2,29	110,34 ± 2,16
(DOPAC + HVA)/DA	1,95 ± 0,03	0,58 ± 0,02	1,03 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,03
Grupo I - 1 mg/kg p.c.					
DA	139,66 ± 2,82	141,65 ± 4,34	3352,37 ± 33,52	513,26 ± 40,26	465,43 ± 4,70
DOPAC	26,22 ± 0,51	50,08 ± 1,00	750,67 ± 22,52	103,26 ± 2,13	58,87 ± 1,19
HVA	176,71 ± 1,78	27,81 ± 0,28	567,40 ± 5,67	44,89 ± 1,36	109,24 ± 1,10
(DOPAC + HVA)/DA	1,97 ± 0,04	0,57 ± 0,02	1,02 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,02
Grupo II - 5 mg/kg p.c.					
DA	88,62 ± 10,51 (-41 %)**	80,00 ± 13,09 (-45 %)**	2715,50 ± 298,04	321,20 ± 25,09 (-36 %)**	304,50 ± 37,48 (-35 %)**
DOPAC	17,60 ± 1,96 (-32 %)*	29,20 ± 8,27 (-40 %)**	613,2 ± 37,85	56,70 ± 7,35 (-47 %)**	26,54 ± 3,54 (-56 %)**
HVA	181,12 ± 3,45	27,20 ± 4,58	548,65 ± 68,58	13,20 ± 2,36 (-72 %)**	111,16 ± 18,71
(DOPAC + HVA)/DA	2,25 ± 0,29	0,64 ± 0,12	1,23 ± 0,19	0,40 ± 0,04	0,43 ± 0,08
Grupo III - 10 mg/kg p.c.					
DA	78,79 ± 16,88 (-44 %)**	68,00 ± 23,15 (-53 %)**	1090,35 ± 165,2 (-67 %)**	255,20 ± 15,01 (-49 %)**	127,00 ± 35,56 (-75 %)**
DOPAC	15,22 ± 2,58 (-41 %)**	27,08 ± 5,01 (-46 %)**	480,70 ± 112,66 (-37 %)**	31,60 ± 3,27 (-71 %)**	23,00 ± 4,70 (-56 %)**
HVA	172,20 ± 19,73	18,45 ± 4,75 (-35 %)**	551,99 ± 56,91	9,62 ± 2,75 (-79 %)**	67,40 ± 17,36 (-34 %)**
(DOPAC + HVA)/DA	2,90 ± 0,56	0,87 ± 0,14	1,50 ± 0,21	0,36 ± 0,05	0,67 ± 0,11
Grupo IV - 20 mg/kg p.c.					
DA	63,60 ± 15,55 (-55 %)	67,59 ± 20,13 (-53 %)**	621,11 ± 163,45 (-81 %)**	156,60 ± 20,21 (-69 %)**	118,43 ± 20,59 (-77 %)**
DOPAC	13,60 ± 0,26 (-48 %)**	25,18 ± 0,97 (-49 %)**	357,34 ± 96,78 (-53 %)**	5,65 ± 1,13 (-95 %)**	25,65 ± 2,91 (-57 %)**
HVA	46,38 ± 14,27 (-75 %)**	10,40 ± 2,79 (-60 %)**	421,55 ± 89,93 (-26 %)*	10,19 ± 1,85 (-78 %)**	43,37 ± 11,64 (-60 %)**
(DOPAC + HVA)/DA	4,30 ± 0,19	0,53 ± 0,01	1,76 ± 0,17 (72 %)**	0,27 ± 0,03	0,62 ± 0,12

Los datos se expresan como los valores medios ± D.S., n=5. Las diferencias significativas con respecto al grupo control corresponden a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).



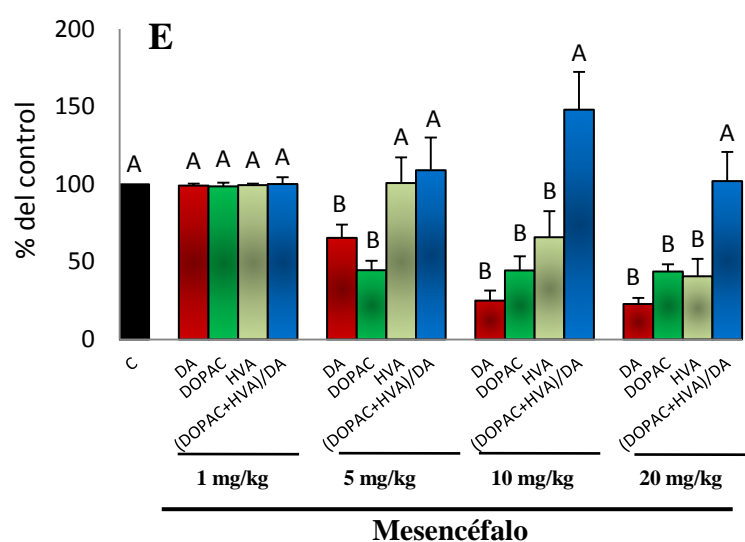
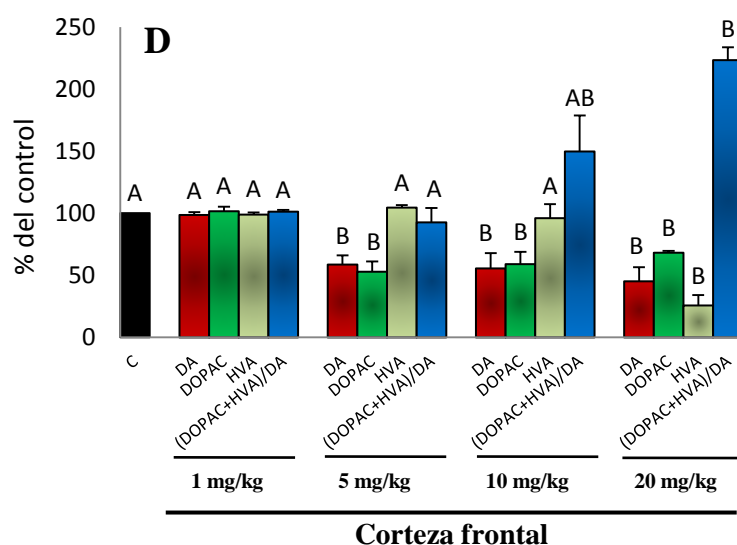


Figura 14. Efecto de ciflutrin a dosis oral de 1, 5, 10 and 20 mg/kg/día p.c. durante 6 días consecutivos sobre los niveles de DA (■), de sus metabolitos DOPAC (■) HVA (■) y la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA, ■) en regiones cerebrales de ratas machos (A, B, C, D, E).

Los datos se expresan como valores medios \pm D.S. y como porcentajes respecto del control (■). Letras distintas muestran diferencias significativas entre los grupos (ANOVA con la prueba *post-hoc* de Duncan).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El piretroide Tipo II ó α -ciano ciflutrin se registró para su uso por primera vez en los Estados Unidos en 1987 (USEPA, 1987). Es utilizado frecuentemente en agricultura frente a saltamontes y otras plagas, en áreas industriales y residenciales, en medicina veterinaria y salud pública, y también en algunos países para proteger productos que están almacenados (RITTER y CHAPPEL, 1997; FAO, 1999). En comparación con otros piretroides Tipo II, ciflutrin tiene una toxicidad oral aguda relativamente alta en ratas machos ($DL_{50} = 250$ mg/kg p.c.) (EMEA, 2000). El presente estudio proporciona nuevos datos de la toxicocinética de ciflutrin tras dosis únicas IV y oral en ratas (3 y 20 mg/kg p.c., respectivamente). Este es el primer estudio que describe los parámetros cinéticos de ciflutrin en plasma y tejidos del SNC.

En el presente estudio, dosis única IV y oral de ciflutrin de 3 y 20 mg/kg p.c., respectivamente, no causaron mortalidad, ni efectos adversos visibles en los animales tratados, es decir, no se observaron signos clínicos de disfunción en ninguno de los animales. Todos los animales fueron observados diariamente (antes y después del tratamiento). Se observó el estado general de las ratas por una visualización de la piel, pelo, ojos, nariz, cavidad oral, abdomen y genitales externos, se evaluó la respiración y se palpó la masa corporal. El comportamiento de las ratas durante el ensayo toxicocinético fue normal, no mostrando los animales ninguna reacción de movimiento frente a su manejo.

En el presente estudio, se determinaron las concentraciones plasmáticas de ciflutrin tras una administración única IV y oral (Figura 10). El análisis de las curvas de concentración plasmática *versus* tiempo de ciflutrin indicaban una disminución bifásica, ajustándose adecuadamente a un modelo bicompartimental abierto para su análisis cinético. Los valores de los parámetros cinéticos plasmáticos obtenidos que describen la

cinética de absorción y disposición de ciflutrin en ratas tras administración IV y oral se presentan en la Tabla 16, donde se puede observar que cuando el piretroide ciflutrin se administra por vía oral, éste se absorbe ampliamente pero más bien de forma lenta. La semivida plasmática de absorción oral ($t_{1/2a}$) fue de $1,58 \pm 0,23$ h y la concentración plasmática máxima (C_{max}) fue de $0,385 \pm 0,051$ $\mu\text{g/mL}$, alcanzada en un tiempo (T_{max}) de $3,39 \pm 0,41$ h tras la administración oral. El tiempo medio de absorción (MAT) después de la administración oral fue de $2,01 \pm 0,59$ h. La biodisponibilidad (F) de ciflutrin después de la administración oral fue de $71,60 \pm 12,36$ %.

La eliminación plasmática de ciflutrin en ratas fue lenta. Las semividas de eliminación ($t_{1/2\beta}$) después de la administración IV y oral fueron $13,46 \pm 0,93$ h y $17,15 \pm 1,67$ h, lo que indica la lenta eliminación del piretroide ciflutrin del plasma, también observado por los valores del tiempo medio de residencia (MRT) $16,87 \pm 1,33$ h para la dosis IV y de $18,88 \pm 1,61$ h para la dosis oral. La semivida de eliminación calculada tras la administración IV ($t_{1/2\beta} = 13,46 \pm 0,93$ h) aumentó en un 27 % (a $17,15 \pm 1,67$ h) $P < 0,001$ tras la administración oral. Esto sugiere que en ratas la disposición plasmática de ciflutrin después de su administración oral está condicionada por el proceso de absorción.

El aclaramiento corporal total (CL) obtenido para el piretroide ciflutrin fue de $2,36 \pm 0,14$ L h/kg tras administración IV y $2,34 \pm 0,01$ L h/kg tras administración oral.

Los parámetros cinéticos plasmáticos obtenidos en el presente estudio para el piretroide ciflutrin podrían ser comparables en parte con datos publicados para los piretroides Tipo II deltametrin y lambda-cialotrin (ANADÓN *et al.*, 1996; ANADÓN *et al.*, 2006). Entre los parámetros cinéticos plasmáticos calculados en el presente estudio tras la administración oral de ciflutrin, la biodisponibilidad muestra las mayores diferencias con otros piretroides Tipo II. Mientras que la biodisponibilidad oral descrita

para deltametrin es relativamente baja ($F = 14,43 \%$) (ANADÓN *et al.*, 1996) en comparación con la obtenida en el presente estudio por el ciflutrin, la biodisponibilidad oral de otro piretroide Tipo II, lambda-cialotrin ($F = 67,37 \%$) (ANADÓN *et al.*, 2006) fue algo más similar a la observada en este estudio para ciflutrin ($F = 71,60 \%$). Con respecto a la semivida de eliminación plasmática de lambda-cialotrin, tras la administración oral, fue más corta ($t_{1/2\beta} = 10,27 \text{ h}$) (ANADÓN *et al.*, 2006) que las obtenidas para deltametrin ($t_{1/2\beta} = 38,50 \text{ h}$) (ANADÓN *et al.*, 1996) y para ciflutrin ($t_{1/2\beta} = 17,15 \text{ h}$), piretroide objetivo de este estudio. Estos efectos podrían deberse en parte a las diferencias derivadas del metabolismo de los piretroides. En general, los piretroides sufren en su metabolismo reacciones de ruptura del éster, produciéndose a continuación una serie de alcoholes y ácidos carboxílicos, compuestos que son conjugados con ácido glucurónico, glicina y sulfato, excretándose vía urinaria. La hidrólisis por esterasas y las reacciones oxidativas que involucran al sistema citocromo P450 parecen ser el centro del metabolismo. (HARRISON, 1983; RUZO *et al.*, 1978; RUZO *et al.*, 1979; COLE *et al.*, 1982; ANADÓN *et al.*, 1996; ANADÓN *et al.*, 2013b).

Aunque se sugiere que el hombre puede tolerar una mayor exposición a piretroides que a otros insecticidas, parestesia e irritaciones de la piel y del tracto respiratorio comúnmente se han descrito en el hombre tras exposición ocupacional a piretroides Tipo II ó α -ciano (SAILLENFAIT *et al.*, 2015). La presencia de metabolitos de los piretroides en orina en poblaciones expuestas ha confirmado esta exposición que cada vez va aumentando por el mayor uso de los insecticidas piretroides (LU *et al.*, 2013).

La afinidad de los piretroides por el sistema nervioso central y periférico ha sido demostrada por diferentes autores (VERSCOYLE y ALDRIDGE, 1980;

VIJVERBERG y VAN DENBERCKEN, 1990; HANSEN *et al.*, 2017). El presente estudio muestra que ciflutrin (después de la dosis oral única de 20 mg/kg p.c.) atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, entra en SNC y se detecta ampliamente en las regiones cerebrales hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal (Figura 11 y Tabla 25). En el presente estudio se demuestra que se alcanzan concentraciones máximas de ciflutrin en todas las regiones del cerebro evaluadas aproximadamente al mismo tiempo (T_{max}). Las concentraciones de ciflutrin en plasma y en los tejidos nerviosos hipotálamo y cuerpo estriado mostraron diferencias estadísticas significativas. Los niveles medios de ciflutrin en los tejidos nerviosos *versus* tiempo se presentan en la Figura 12, donde se puede observar que al igual que en el plasma, la disposición de ciflutrin en los tejidos nerviosos estudiados después de administración oral en ratas se ajusta adecuadamente a un modelo bicompartimental abierto para su análisis cinético; los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 25.

Después de la administración oral, se alcanzaron concentraciones máximas de ciflutrin (C_{max} , en un rango de 0,40 a 1,21 $\mu\text{g/g}$) en las regiones del cerebro estudiadas a tiempos muy similares (T_{max} , en un rango de 4,02 a 4,56 h). De forma similar a los resultados descritos previamente para los piretroides deltametrin y lambda-cialotrin (ANADÓN *et al.*, 1996; ANADÓN *et al.*, 2006), la mayor C_{max} del piretroide ciflutrin fue detectada en el hipotálamo. La concentración máxima (C_{max}) del piretroide ciflutrin en el hipotálamo (C_{max} , $1,21 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) fue aproximadamente 3,3 veces mayor que la del plasma (C_{max} , $0,385 \pm 0,051 \mu\text{g/mL}$) $P < 0,001$. Igualmente, las áreas bajo la curva concentración *versus* tiempo ($AUC_{(0-24)}$) para ciflutrin en los tejidos nerviosos analizados fueron significativamente más altas que el $AUC_{(0-24)}$ observado en plasma (Tabla 25); siendo la mayor diferencia observada en el hipotálamo con un valor de $AUC_{(0-24)}$ de $19,36 \pm 2,56 \text{ mg h/L}$ en comparación al valor del $AUC_{(0-24)}$ en plasma de

6,11 ± 1,06 mg h/L, $P < 0.001$ (Tabla 25). KHANNA *et al.* (2002) estudiaron la cinética de la distribución del piretroide cipermetrin (tras la administración IV) en diferentes regiones cerebrales (corteza cerebral, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal) en conejos, y observaron que aquellas regiones del SNC con alto contenido de mielina (tronco encefálico y médula espinal) presentaban la mayor C_{\max} de cipermetrin, lo que demuestra que los piretroides podrían distribuirse diferencialmente en el SNC.

En el presente estudio, las semividas de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de ciflutrin en las diferentes regiones del cerebro estudiadas presentan valores en un rango de 18,48 a 22,73 h, tras la administración oral de este piretroide, lo que demuestra que una vez entra en el cerebro, ciflutrin se elimina lentamente. Las semividas de eliminación ($t_{1/2\beta}$) obtenidas en el hipotálamo ($t_{1/2\beta} = 22,73 \pm 1,60$ h) ($P < 0.001$) y la corteza frontal ($t_{1/2\beta} = 19,82 \pm 1,26$ h) ($P < 0.01$) fueron significativamente más altas que la $t_{1/2\beta}$ en el plasma ($t_{1/2\beta} = 17,15 \pm 1,67$ h) (Tabla 25). La relativa acumulación de ciflutrin en el SNC también se refleja por la razón del área bajo la curva de concentración-tiempo de las diferentes regiones cerebrales frente al plasma. La mayor relación de $AUC_{(0-24)\text{tejido}} / AUC_{(0-24)\text{plasma}}$ para ciflutrin fue de 3,17 en el hipotálamo (Tabla 25). En nuestro estudio, uno de los principales tejidos nerviosos diana parece ser el hipotálamo, hallazgo similar a los observados para los piretroides Tipo II deltametrin y lambda-cialotrin (ANADÓN *et al.*, 1996; ANADÓN *et al.*, 2006). Estudios con piretroides Tipo II, como deltametrin, han demostrado que las concentraciones de deltametrin en plasma y en tejidos cerebrales parecen correlacionarse con la gravedad de la toxicidad (RICKARD y BRODIE, 1985; SHEETS *et al.*, 1994; ANADÓN *et al.* 1996).

En conclusión, la presente investigación es el primer estudio toxicocinético del ciflutrin realizado en un modelo animal (ratas Wistar macho adultas) después de administración de dosis única IV y oral. Ciflutrin se absorbe rápidamente y alcanza la

circulación sistémica después de su administración oral; ciflutrin cruza la barrera hematoencefálica y alcanza concentraciones considerables en el SNC. La región cerebral hipotálamo fue la que presentó una mayor concentración y acumulación de ciflutrin. Ciflutrin se elimina lentamente del plasma y de los tejidos nerviosos del SNC estudiados, principalmente del hipotálamo. Nuestros resultados muestran que el uso indiscriminado del insecticida ciflutrin podría soportar no sólo un riesgo como contaminante ambiental, sino también podría afectar la salud humana, podría inducir trastornos neurológicos después de una exposición prolongada incluso a dosis moderadas. Los datos descritos en esta investigación son importantes, ya que podrían constituir la base para futuros estudios de neurotoxicidad y de seguridad de este plaguicida.

En base al perfil toxicocinético observado en el presente estudio, y asumiendo que los piretroides son cada vez más utilizados como pesticidas con amplia presencia en el medio ambiente, cada vez más surge en el campo científico y legislativo una mayor preocupación en la evaluación de su seguridad en vistas a salud pública. Los piretroides son compuestos altamente lipofílicos, cruzan la barrera hematoencefálica como se ha demostrado en el presente estudio y otros previos (ANADÓN *et al.*, 1996 y ANADÓN *et al.*, 2006), pueden alcanzar concentraciones potencialmente neurotóxicas en SNC, especialmente cuando la exposición a estos plaguicidas se produce en la vida temprana (cuando el cerebro está en una fase altamente activa de neurodesarrollo como la sinaptogénesis) (NASUTI *et al.*, 2013). Tras una exposición prolongada a dosis moderadas, los piretroides pueden inducir complicaciones neurológicas (SINGH *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la exposición a cipermetrin en ratas macho durante el periodo postnatal y periodo adulto originan una degeneración dopaminérgica, siendo

más susceptibles los animales durante el periodo postnatal, día 5-19 (SINGH *et al.*, 2012).

Es conocido que el principal mecanismo de acción de los piretroides es la alteración del flujo de ion sodio a través de los canales de sodio voltaje-dependientes, alterando el funcionamiento del sistema nervioso tanto en insectos como en mamíferos (NARAHASHI, 1996; HOSSAIN y RICHARDSON, 2011). Los piretroides son compuestos neurotóxicos que también afectan, principalmente los piretroides Tipo II ó α -ciano, a los canales de calcio y cloruro voltaje-dependientes, a los receptores GABAA y a la liberación de neurotransmisores (NARAHASHI, 1996; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA *et al.*, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2004; SHAFER *et al.*, 2005; RAY y FRY, 2006; BROWN *et al.*, 2006; NASUTI *et al.*, 2007; BRECKENRIDGE *et al.*, 2009).

En su segundo objetivo, el presente estudio, demostró que tras administración oral (5, 10 y 20 mg/kg p.c. durante 6 días) el piretroide ciflutrin produjo de forma dosis dependiente una disminución estadísticamente significativa de los niveles del neurotransmisor 5-HT en todas las regiones cerebrales estudiadas (hipotálamo, cuerpo estriado, mesencéfalo, hipocampo y corteza frontal). Además, los niveles del metabolito 5-HIAA también disminuyeron y por el contrario la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) se incrementó en estas regiones cerebrales estudiadas (Figura 13 y 15). Otros piretroides Tipo II, como el deltametrin y el lambda-cialotrin, también originan una disminución en la síntesis de serotonina y una pérdida de neuronas serotoninérgicas (MARTÍNEZ-LARRAÑAGA *et al.*, 2003). Existe evidencia de que la exposición a diferentes tipos de plaguicidas afectan la integridad del sistema serotoninérgico (SLOTKIN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011). La disminución de los niveles de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA inducida por piretroides Tipo II podría estar relacionada con cambios

neurodegenerativos que podrían causar trastornos como el síndrome conductual inducido por 5-HT (GREEN y HEAL, 1985). Nuestros hallazgos nos permiten afirmar que el piretroide ciflutrin podría estar involucrado o ser causa de efectos neurotóxicos que implican la pérdida del contenido de 5-HT a nivel cerebral.

El papel de los piretroides en la neurodegeneración dopaminérgica viene siendo una materia de debate en la última década. SINGH *et al.* (2012) demuestran reducciones en el nivel de DA en ratas tras exposición prolongada de cipermetrin a dosis moderada. En el presente estudio también se demostró que ciflutrin originó una disminución del contenido de DA y de sus metabolitos (DOPAC y HVA), así como un aumento de la tasa de recambio (DOPAC + HVA / DA) en todas las regiones del cerebro estudiadas (hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo, corteza frontal y mesencéfalo) (Figura 14 y 15). Existe evidencia que la DA está ampliamente distribuida en el SNC y regula funciones farmacológicas y fisiológicas tales como el control de la locomoción, y el aprendizaje, así como también afectan la secreción neuroendocrina (HUSAIN *et al.*, 1996 y MISSALE *et al.*, 1998).

Nuestro estudio demostrando que ciflutrin origina una pérdida del neurotransmisor DA, podría indicar que la disminución del contenido de DA podría también deberse bien a una inhibición de la biosíntesis de DA, a una disminución de los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), o a una disminución de la síntesis de la enzima dopa-descarboxilasa. LIU y SHI (2006) demuestran que en células PC12, modelo *in vitro* de células dopaminérgicas, el piretroide deltametrin disminuye el contenido de DA por la inhibición de la expresión génica de TH.

El piretroide Tipo II ó α -ciano ciflutrin se caracteriza por ser un éster de alcohol secundario con un grupo ciano en el carbono α del residuo alcohol. Por lo tanto, la toxicidad del ciflutrin también podría deberse a la liberación de cianhidrinas

químicamente inestables. Las cianhidrinas se descomponen en cianuros y aldehídos, que a su vez pueden actuar como fuente de radicales libres (EL-DEMERDASH, 2007); la producción de estrés oxidativo podría ser otra causa a la disminución de los niveles de los neurotransmisores 5-HT y DA tras la exposición de ciflutrin. Se conoce que las neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal son susceptibles al daño producido por especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a su alto consumo de oxígeno, el alto contenido de lípidos, el nivel relativamente bajo de eliminadores de oxidantes endógenos y la alta concentración de hierro que se requiere para la actividad de enzimas, clave de la síntesis de DA (SIMONIAN y COYLE, 1996; LIU y SHI, 2006).

Se ha demostrado que los piretroides causan daño oxidativo en varias especies animales (EL-DEMERDASH *et al.*, 2003, GIRAY *et al.*, 2001 y PRASAMTHI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2016), siendo la peroxidación lipídica uno de los principales mecanismos de toxicidad de estos compuestos (KOVACIC, 2003, TIWARI *et al.*, 2010), así como disminución de las actividades de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa (LIU y SHI, 2006). En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se observó *in vitro* en células neuronales SH-SY5Y que seis piretroides de Tipo II (α -cipermetrin, ciflutrin, lambda-cialotrin, deltametrin, cifenotrin y esfenvalerato) inducen la producción de óxido nítrico y la peroxidación lipídica (ROMERO *et al.* 2015). Recientemente nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un estudio *in vivo*, donde se observó que el piretroide de Tipo II lambda-cialotrin alteró la función oxidativa en el tejido hepático de ratas, especialmente a la dosis más alta (8 mg lambda-cialotrin/kg p.c. durante 6 días) se observó un incremento en las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa 2 (SOD2), y una disminución en las actividades glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa. Además, el piretroide lambda-cialotrin originó un aumento en la

expresión del ARNm de dos genes reguladores de estrés oxidativo Nrf2 y NFκB (MARTÍNEZ *et al.*, 2018).

El estrés oxidativo es motivo de preocupación en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (PATEL *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010). Recientemente, TRIPATHI *et al.* (2014) demostraron que el piretroide cipermetrin disminuyó el contenido de DA estriatal alterando el estado de los indicadores de estrés oxidativo y el sistema de defensa antioxidante; este mecanismo de estrés oxidativo podría ser de importante a la hora de predecir la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal y la toxicidad nigroestriatal relacionada con trastornos neurológicos (Figura 16).

En nuestro estudio hemos observado una depleción del neurotransmisor DA en las diferentes regiones cerebrales estudiadas. Este efecto podría deberse a la alteración del metabolismo de la DA, específicamente en la función de la TH, del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2), o del transportador de dopamina (DAT). XIONG *et al.* (2016) mencionan que el Fenpropatrin, piretroide ampliamente utilizado en agricultura y en el hogar, también tiene efectos neurotóxicos caracterizado en roedores. Por otra parte, fenpropatrin produjo *in vitro* en las células SH-SY5Y muerte celular, generación de especies reactivas de oxígeno, agregación de proteínas asociadas con cuerpos de Lewy y formación de inclusiones intracitoplasmáticas parecidas a cuerpos de Lewy. *In vivo* las ratas mostraron disminución de la actividad de la TH y disminución de la inmunoreactividad del VMAT2, mientras que se observó inmunoreactividad aumentada del DAT.

Otros estudios han demostrado que la exposición repetida a los plaguicidas piretroides a ratones, tienen efectos similares a nuestros resultados pues los piretroides deltametrin y permetrin incrementan la recaptación sinaptosomal de DA. (KIRBY *et al.*,

1999; KAREN *et al.*, 2001; GILLETTE y BLOOMQUIST, 2003). Este efecto sobre la recaptación de DA está mediado por el DAT y es considerado importante como un factor para el desarrollo de alteraciones en el sistema nervioso. El aumento de la expresión del DAT (GILLETTE y BLOOMQUIST, 2003) y aumento de la recaptación de DA mediada por DAT (BLOOMQUIST *et al.*, 2002; ELWAN *et al.*, 2006) se determinaron en ratones expuestos a piretroides, y teniendo en cuenta el aumento de la expresión de DAT se ha observado en algunos estudios de individuos con trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (MADRAS *et al.*, 2005) y que el déficit de DA es considerada parte de su neurofisiología (RASKIN *et al.*, 1984), es posible que la exposición a piretroides pudiera ser un factor de riesgo para el desarrollo de TDAH. De hecho, numerosos estudios han demostrado que roedores expuestos a piretroides durante la etapa del neurodesarrollo han incrementado su actividad locomotora durante la edad adulta (BURNS *et al.*, 2013; ERIKSSON y FREDRIKSSON, 1991; ERIKSSON y NORDBERG, 1990; TALTS *et al.*, 1998; AHLBOM *et al.*, 1994; RICHARDSON *et al.*, 2015).

Actualmente, los plaguicidas están siendo considerados como parte de los factores que intervienen en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP). En la EP las neuronas de la sustancia negra se degeneran progresivamente por lo que disminuye la cantidad de DA disponible para la neurotransmisión en el cuerpo estriado (EHRINGER y HORNYKIEWICZ, 1960). El desequilibrio neuroquímico de DA se manifiesta con síntomas clínicos típicos que incluyen temblor en reposo, rigidez, bradicinesia y pérdida de los reflejos posturales (WALTON, 1977; WOOTEN, 1990; REWCASTLE, 1991; FAHN, 1986). Además, el deterioro de la neurotransmisión dopaminérgica que se produce en el parkinsonismo puede conducir a un aumento en la transmisión glutamatérgica corticostriatal, lo que

puede contribuir a reforzar el desequilibrio entre los subgrupos del sistema neuronal estriatal que controlan la producción funcional de los ganglios basales que involucra al GABA (ROBERTSON *et al.*, 1990).

En el presente trabajo de investigación hemos observado la depleción en cerebro de ratas de los neurotransmisores 5-HT y DA, esta misma depleción se presenta a largo plazo en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA). Diversos estudios han demostrado posibles asociaciones entre la enfermedad de Alzheimer (EA) y la alteración de grupos neuronales serotoninérgicos y dopaminérgicos (KAR *et al.*, 2004). Hay evidencias que sugieren que la exposición acumulativa crónica a los pesticidas puede generar efectos tóxicos duraderos sobre el sistema nervioso central y contribuir al desarrollo de la EA. Otros estudios indican una asociación potencial entre la exposición a pesticidas a largo plazo a dosis bajas y la presentación de la EA (YAN *et al.*, 2016). La implicación de DA en la EA se ha investigado durante mucho tiempo y todavía está en debate (PORTET *et al.*, 2009; TRILLO *et al.*, 2013). El sistema dopaminérgico experimenta varios cambios durante el proceso de envejecimiento fisiológico. En general, la disminución de la secreción de DA, la reducción de la expresión del receptor D2 de DA, la reducción de la expresión de DAT en el núcleo caudado, hipocampo y corteza frontal en humanos son características comúnmente observadas en el cerebro durante el envejecimiento cerebral (VOLKOW *et al.*, 1994; BÄCKMAN *et al.*, 2010). La liberación reducida de glutamato en la corteza frontal, hipocampo y amígdala induciría una disminución adicional de la liberación de DA, induciendo hipoactividad, alteraciones de la marcha y declive de las funciones neuronales. Se sugiere que la aparición de apatía, un signo pronóstico negativo tanto en ancianos como en la EA, es la consecuencia del deterioro de la transmisión de DA observado durante el envejecimiento normal (ROBERT *et al.*, 2010). Del mismo modo,

en los pacientes con EA, la apatía y la disfunción ejecutiva tienen un valor pronóstico negativo y se consideran predictivos de una disminución cognitiva más rápida y un acortamiento de la vida (MUSICCO *et al.*, 2010; KOCH *et al.*, 2013). Tanto en los procesos fisiológicos como en los patológicos, la aparición de disfunción de DA representa una evolución pronóstica negativa. Por lo tanto, cuanto más temprano se produzca el deterioro del sistema dopaminérgico será más rápido el declive cognitivo, lo que indica que hay una posible asociación entre la disminución de DA y la EA (BURNS *et al.*, 2005; ATTEMS *et al.*, 2007). Además, los resultados experimentales que demuestran la relación de la DA en la patogénesis de la EA, así como datos experimentales de ratones transgénicos EA mostraron como la neurodegeneración dopaminérgica y la deposición amiloide están estrechamente relacionadas, lo que sugiere un papel causal de la disfunción de DA en la formación de placas de amiloide (PEREZ *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la restauración de la transmisión de DA desempeña un papel en la memoria y el aprendizaje en un modelo de ratón EA (GUZMÁN-RAMOS *et al.*, 2012).

La fisiología del neurotransmisor 5-HT ha sido asociada con el bienestar anímico, funciones en el sueño, la depresión, la memoria, el dolor y la agresión. En el presente trabajo se observa una disminución significativa dosis dependiente de 5-HT, lo que supone que el piretroide ciflutrin podría asociarse con la alteración de la fisiología de la 5-HT en el SNC. Estudios recientes en ratones indican que la señalización de la 5-HT se reduce significativamente en los modelos de ratones de Enfermedad de Huntington (EH) en comparación con los ratones sin EH, además menores niveles de la 5-HT en cerebro puede tener un gran impacto en la progresión de la EH. La disminución de 5-HT puede contribuir al desarrollo de EH o puede ser simplemente el resultado de otro mecanismo de esta enfermedad. Algunos de los síntomas clínicos comunes de EH,

como la alteración del comportamiento en el hombre, se han asociado con la disminución de 5-HT en SNC en pacientes con EH (VAN DUIJN *et al.*, 2007; KROGIAS *et al.*, 2010, KROGIAS *et al.*, 2011).

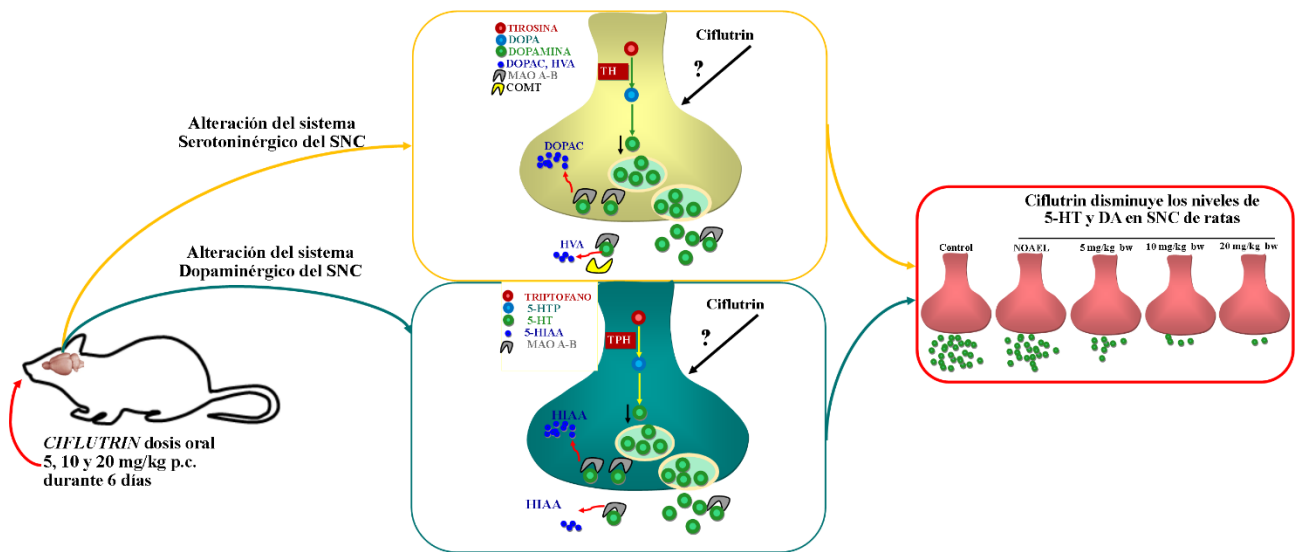


Figura 15. Efecto neurotóxico del piretroide Tipo II α -ciano ciflutrin sobre el SNC. Alteración del sistema serotoninérgico (depleción de 5-HT) y del sistema dopaminérgico (depleción de DA)

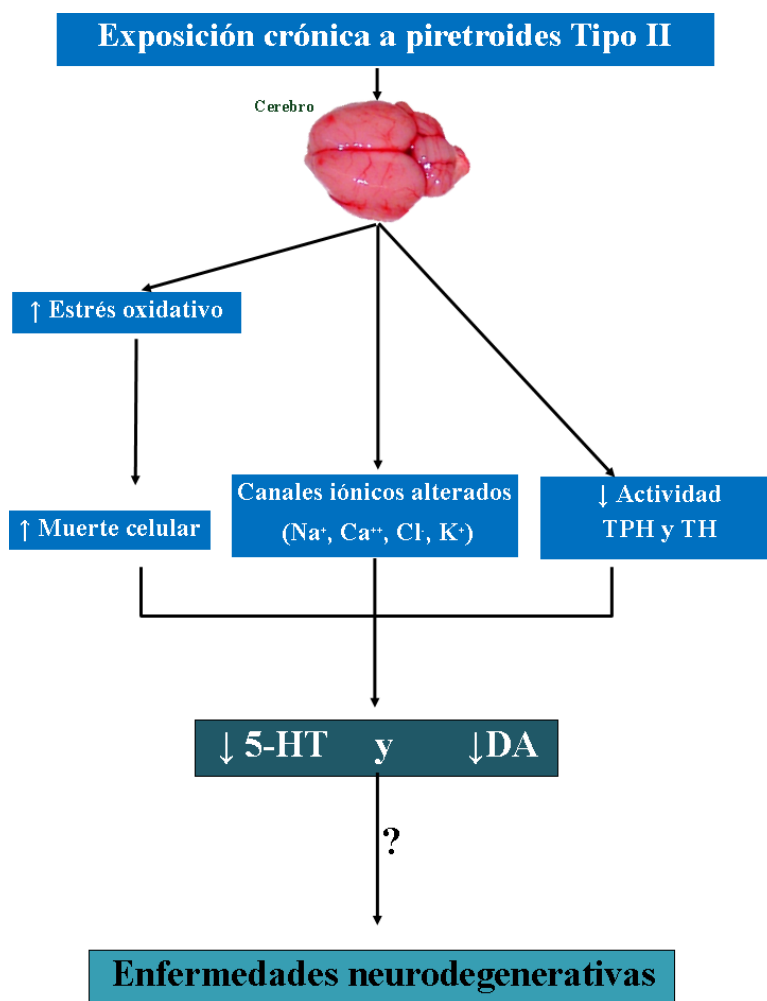


Figura 16. Vías de exposición crónica a piretroides que podrían asociarse a desordenes neurológicos relacionados a la pérdida de 5-HT y DA.

TPH (triptófano hidroxilasa); TH (tirosina hidroxilasa)

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

(1) Asumiendo los parámetros toxicocinéticos identificados, la presente investigación sirve para comprender mejor la toxicidad del piretroide Tipo II o α -ciano ciflutrin en mamíferos. Ciflutrin es rápidamente absorbido tras administración oral, pasa a circulación sistémica y atraviesa la barrera hematoencefálica alcanzándose concentraciones considerables en el cerebro.

(2) El piretroide ciflutrin administrado oralmente a ratas a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg p.c. durante 6 días originó, de forma dosis-dependiente, una depleción de los niveles de los neurotransmisores 5-HT y DA y de sus metabolitos en los tejidos del SNC hipotálamo, corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y mesencéfalo (Figura 15). Ciflutrin, de forma dosis-dependiente aceleró la tasa de recambio de 5-HT y DA en los tejidos del SNC mesencéfalo, cuerpo estriado y corteza frontal.

(3) Nuestros resultados sugieren que el uso indiscriminado del insecticida ciflutrin, como contaminante ambiental, potencialmente puede originar alteraciones neurológicas a corto plazo, así como también a largo plazo tras una exposición de dosis moderadas (Figura 16).

Los resultados del presente estudio deben ser considerados para diseñar futuros estudios implicados en neurotoxicidad y en la seguridad de uso de este plaguicida.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo recoge los resultados de dos objetivos:

1. El primer objetivo evaluó la toxicocinética en plasma y en tejidos del sistema nervioso central del piretroide Tipo II α -ciano ciflutrin tras administración de dosis única IV (3 mg/kg p.c.) y oral (20 mg/kg p.c.) en rata Wistar macho.

1.1. Las curvas de niveles plasmáticos *versus* tiempo de ciflutrin tras administración IV y oral, y las curvas de niveles tisulares *versus* tiempo de ciflutrin tras administración oral, se ajustan adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético.

1.2. Tras administración oral de ciflutrin, la cinética plasmática demuestra que este piretroide se absorbe rápidamente y ampliamente, con una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de $1,58 \pm 0,23$ h, alcanzándose una concentración máxima plasmática (C_{max}) de $0,385 \pm 0,051$ $\mu\text{g/mL}$ en un tiempo (T_{max}) de $3,39 \pm 0,41$ h. La biodisponibilidad oral o fracción de dosis absorbida fue $71,60 \pm 12,36$ %.

1.3. Después de la administración oral de ciflutrin, la cinética plasmática demuestra que este piretroide se elimina lentamente, con una semivida de eliminación de la fase β ($t_{1/2\beta}$) de $17,15 \pm 1,67$ h, semivida de eliminación algo más lenta que la obtenida tras administración IV ($t_{1/2\beta} = 13,46 \pm 0,93$ h), lo que sugiere que la disposición plasmática de ciflutrin tras administración oral está condicionada a los procesos de absorción.

1.4. Tras administración oral, el piretroide ciflutrin se distribuye ampliamente en los tejidos cerebrales estudiados hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza frontal. El área bajo la curva de concentración-tiempo [$AUC_{(0-24h)}$] fue significativamente mayor en todos los tejidos cerebrales estudiados en relación con el $AUC_{(0-24h)}$ obtenido en plasma. La mayor diferencia se encontró en el hipotálamo ($AUC_{(0-24h)} = 19,36 \pm 2,56$ mg h/L; $C_{max} = 1,21 \pm 0,11$ μ g/g).

1.5. Después de la administración oral de ciflutrin, la cinética demuestra que este piretroide se elimina también lentamente a partir de todas las regiones cerebrales estudiadas siendo las semividas de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de ciflutrin en las regiones cerebrales en el rango de 18,48 - 22,73 h.

1.6. Asumiendo los parámetros toxicocinéticos identificados, se sugiere que ciflutrin podría inducir neurotoxicidad en el sistema nervioso central en especies no-diana

2. El segundo objetivo evaluó los efectos del piretroide Tipo II α -ciano ciflutrin tras administración oral (1, 5, 10 y 20 mg/kg p.c., 6 días) sobre los niveles de los neurotransmisores serotonina, dopamina y metabolitos en tejidos del sistema nervioso central (hipotálamo, corteza frontal, mesencéfalo, hipocampo y cuerpo estriado) en ratas Wistar macho.

2.1. Ciflutrin (5, 10 y 20 mg/kg p.c., 6 días, oralmente) originó un descenso, estadísticamente significativo, de los niveles de serotonina y su metabolito (ácido 5-hidroxi-3-indol-acético), y de los niveles de dopamina y de sus metabolitos (ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido homovanílico), de forma región cerebral- y dosis-dependiente.

2.2. Ciflutrin (20 mg/kg p.c., 6 días, oralmente) originó un incremento, estadísticamente significativo, en la tasa de recambio de serotonina en cuerpo estriado y mesencéfalo, así como también un incremento en la tasa de recambio de dopamina en cuerpo estriado y corteza frontal.

2.3. Tras la exposición oral de ciflutrin, los resultados observados de la pérdida del contenido de los neurotransmisores serotonina, dopamina y metabolitos en las regiones cerebrales hipotálamo, corteza frontal, mesencéfalo, hipocampo y cuerpo estriado sugiere que la determinación de estos neurotransmisores en regiones cerebrales pudiera considerarse como un biomarcador de neurotoxicidad inducida por agentes químicos. También nuestros resultados apuntan que un uso indiscriminado del insecticida piretroide ciflutrin pudiera inducir desordenes neurológicos tras una exposición a largo plazo de dosis moderadas.

2.4. Los resultados obtenidos y descritos en la presente memoria deberían ser considerados para futuras investigaciones en el campo de la neurotoxicidad y usados para evaluar la seguridad de los plaguicidas piretroides.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, L., FRANCO, M. C. & ESTEVEZ, A. G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 240, 711-717.

AHLBOM, J., FREDRIKSSON, A. & ERIKSSON, P. (1994). Neonatal exposure to a type-I pyrethroid (bioallethrin) induces dose–response changes in brain muscarinic receptors and behaviour in neonatal and adult mice. *Brain Research*, 645, 318-324.

ALDRIDGE, W.N., CLOTHIER, B., FORSHAW, P., JOHNSON, M.K., PARKER, V.H., PRICE, R.J., SKILLETER, D.N., VERSCHOYLE, R.D. & STEVENS, C. (1978). The effect of DDT and the pyrethroids cismethrin and decamethrin on the acetylcholine and cyclic nucleotide content of rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 27, 1703-1706.

ALDRIDGE, W.N. (1990). An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 21, 89-104.

AMWEG, E.L., WESTON, D.P., YOU, J. & LYDY, M.J. (2006). Pyrethroid insecticides and sediment toxicity in urban creeks from California and Tennessee. *Environmental Science & Technology*, 40, 1700-1706.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & DÍAZ, M.J. (1987). Changes in neuromuscular transmission of guinea pig vas deferens produced by decamethrin treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 90, 96-102.

ANADON, A., DIEZ, M. J., SIERRA, M. & SANCHEZ, J. A. (1988). Microsomal enzyme induction by permethrin in rats. *Veterinary and Human Toxicology*, 30, 309-312.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J. & BRINGAS, P. (1991). Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110, 1-8.

ANADÓN, A., MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R., FERNANDEZ-CRUZ, M.L., DIAZ, M.J., FERNANDEZ, M.C. & MARTINEZ, M.A. (1996). Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141, 8-16.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ, M. A., DÍAZ, M. J. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2006). Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicology Letters*, 165, 47-56.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & MARTÍNEZ, M.A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182, 7-20.

ANADÓN, A., ARÉS, I., MARTÍNEZ, M.A., & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2013a). Chapter 137: Pyrethrins and synthetic pyrethroids: Use in veterinary medicine. In: Natural Products, Ramawat Gopal, K., Mérillon, J.M. (Eds.), Springer, Berlín, Heidelberg, pp. 4061-4086. ISBN 978-3-642-22143-9.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ, M., CASTELLANO, V., ARES, I., ROMERO, A., FERNÁNDEZ, R. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2013b). Differential induction of cytochrome P450 isoforms and peroxisomal proliferation by cyfluthrin in rats. *Toxicology Letters*, 220, 135-142.

ANADÓN, A., y MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2017). Capítulo 52: Fármacos Antiparasitarios. En: Velazquez Farmacología Básica y Clínica. P. Lorenzo, A. Moreno, J.C. Leza, I. Lizasoain, M.A. Moro y A. Portoles (Eds). 19ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. pp. 831-856. ISBN 978-607-8546-077.

ANGERER, J. & RITTER, A. (1997). Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 695, 217-226.

APPEL, K.E., MICHALAK, H. & GERICKE, S. (1994). Health risks from pyrethroids? Data on their neurotoxicity, toxicokinetics and human health disorders. *Wissenschaft und Umwelt*, 2, 95-108.

ATTEMS, J., QUASS, M. & JELLINGER, K.A. (2007). Tau and alpha-synuclein brainstem pathology in Alzheimer disease: relation with extrapyramidal signs. *Acta Neuropathologica*, 113, 53-62.

BÄCKMAN, L., LINDENBERGER, U., LI, S.C. & NYBERG, L. (2010). Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: recent data and future avenues. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34, 670-677.

BAKER, S.E., OLSSON, A.O. & BARR, D.B. (2004). Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 281-288.

BARLOW, F., ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., HADAWAY, A.B., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H. & WICKHAM, J.C. (1971). Insecticidal activity of pyrethrins and related compounds. IV. Essential features for insecticidal activity in chrysanthemates and related cyclopropane esters. *Pesticide Science*, 2, 115-118.

BARRUECO, C., HERRERA, A., CABALLO, C. & DE LA PEÑA, E. (1992). Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, 7, 433-437.

BARRUECO, C., HERRERA, A., CABALLO, C. & DE LA PEÑA, E. (1994). Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 14, 31-38.

BARTHEL, W.F. (1961). Synthetic pyrethroids. In: *Advances in Pest Control Research*, Metcalf, R.L. (Ed), Vol. 4, Interscience Publishers, Inc., New York, pp. 33-74. ISBN-10 047059862X

BARTSCH, H. MALAVEILLE, C., CAMUS, A.H., MARTEL-PLANCHE, G., BRUN, G., HAUTEFEUILLE, A., SABADIE, N., BARBIN, A., KUROKI, T., DREVON, C., PICCOLI, C. & MONTESANO, R. (1980). Bacterial and mammalian mutagenicity tests: validation and comparative studies on 180 chemicals. *Mutation Research*, 76, 1-50.

BAYER (1987). Cyfluthrin monograph, Bayer A. G., Alfred Nobel Strasse 50, Leverkusen, F.R.G.

BEHRENZ, W., ELBERT, A. & FUCHS, R. (1983). Cyfluthrin (FCR 1272), a new pyrethroid with long-lasting activity for the control of public health and stored-product pests. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 36, 127-176.

BERLIN, J.R., AKERA, T., BRODY, T.M. & MATSUMURA, F. (1984). The inotropic effects of a synthetic pyrethroid decamethrin on isolated guinea pig atrial muscle. *European Journal of Pharmacology*, 98, 313-322.

BLOOMQUIST, J.R. & SODERLUND, D.M. (1985). Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133, 37-43.

BLOOMQUIST, J.R., BARLOW, R.L., GILLETTE, J.S., LI, W. & KIRBY, M.L. (2002). Selective effects of insecticides on nigrostriatal dopaminergic nerve pathways. *Neurotoxicology*, 23, 537-44.

BRADBURY, J.E., GRAY, A.J. & FORSHAW, P.J. (1981). Protection against toxicity in rats with mephenesin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 60, 382-384.

BRADBURY, S.P. & COATS, J.R. (1982). Toxicity of fenvalerate to bobwhite quail (*Colinus virginianus*) including brain and liver residues associated with mortality. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 10, 307-319.

BRADBURY, J.E., FORSHAW, P.J., GRAY, A.J. & RAY, D.E. (1983). The action of mephenesin and others agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rat. *Neuropharmacology*, 22, 907-914.

BRADBURY, S. P., COATS, J. R. & MCKIM, J. M. (1985). Differential toxicity and uptake of two fenvalerate formulations in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4, 533-541.

BRADBURY, S.P., McKIM, J.M. & COATS, J.R. (1987a). Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute fenvalerate intoxication. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 27, 275-288.

BRADBURY, S.P., SYMONIK, D.M., COATS, J.R. & ATCHISON, G.J. (1987b). Toxicity of fenvalerate and its constituent isomers to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) and bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 727-735.

BRADBURY, S.P. & COATS, J.R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 108, 133-177.

BRECKENRIDGE, C.B., HOLDEN, L., STURGESS, N., WEINER, M., SHEETS, L., SARGENT, D., SODERLUND, D.M., CHOI, J.S., SYMINGTON, S., CLARK, J.M., BURR, S. & RAY, D. (2009). Evidence for a separate mechanism of toxicity for the type I and the type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 30S, S17–S31.

BREESE, M.H. (1977). The potential for pyrethroids as agricultural, veterinary, and industrial insecticides. *Pesticide Science*, 8, 264-269.

BRODIE, M.E. & ALDRIDGE, W.N. (1982). Elevated cerebellar cyclic GMP levels during the deltamethrin-induced motor syndrome. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 4, 109-113.

- BRODIE, M.E. (1983). Correlations between cerebellar cyclic GMP and motor effects induced by deltamethrin: independence of olivo-cerebellar tract. *Neurotoxicology*, 4, 1-11.
- BROOKS, M.W. & CLARK, J.M. (1987). Enhancement of norepinephrine release from rat brain synaptosomes by alpha cyano pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28, 127-132.
- BROWN, D.G. & ADDOR, R.W. (1979). Benzospiro pyrethroids. In: Advances in Pesticide Science (Zurich, 1978), Geissbuhler, H. (Ed), Vol. 2, Pergamon Press, Oxford, pp. 190-195. ISBN 978-0-08-023930-9
- BROWN, L. D. & NARAHASHI, T. (1992). Modulation of nerve membrane sodium channel activation by deltamethrin. *Brain research*, 584, 71-76.
- BROWN, T.P., RUMSBY, P.C., CAPLETON, A.C., RUSHTON, L. & LEVY, L.S. (2006). Pesticides and Parkinson's disease is there a link. *Environmental Health Perspectives*, 114, 156-164.
- BUHAGIAR, T.S, DEVINE, G.J. & RITCHIE, S.A. (2017). Metofluthrin: investigations into the use of a volatile spatial pyrethroid in a global spread of dengue, chikungunya and Zika viruses. *Parasites & Vectors*, 10, 270.
- BURNS, C.J., MCINTOSH, L.J., MINK, P.J., JUREK, A.M. & LI, A.A. (2013). Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. Journal toxicology and environmental health. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 16, 127-283.
- BURNS, J.M., GALVIN, J.E., ROE, C.M., MORRIS, J.C. & MCKEEL, D.W. (2005). The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. *Neurology*, 64, 1397-1403.
- BUSVINE, J.R. (1951). Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, 168, 193-195.

CABALLO, C., HERRERA, A., BARRUECO, C., SANTA-MARÍA, A., SANZ, F. & DE LA PEÑA, E. (1992). Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 12, 243-249.

CARLSON, G.P. & SCHOENIG, G.P. (1980). Induction of liver microsomal NADPH cytochrome *c* reductase and cytochrome P-450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52, 507-512.

CARLTON, M. (1977). Some effects of cismethrin on the rabbit nervous system. *Pest Management Science*, 8, 700-712.

CARPENTER, C.P., WEIL, C.S., POZZANI, U.C. & SMYTH, H.F. (1950). Comparative acute and subacute toxicities of allethrin and pyrethrins. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 2, 420-432.

CASIDA, J.E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 34, 189-202.

CASIDA, J.E., GAMMON, D.W., GLICKMAN, A.H. & LAWRENCE, L.J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 413-438.

CATTERALL, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 16, 521-555.

CHANH, P.H., NAVARRO-DELMASURE, C., CHANH, A.P.H., CLAVEL, P. & GAYREL, P. (1980). Toxicity and cardiovascular effects of decamethrin on anaesthetized dogs. *IRCS Medical Science-Biochemistry*, 8, 388-389.

CHANH, P.H., NAVARRO-DELMASURE, C., CHANH, A.P.H. & MARTÍNEZ, C. (1981). Effects of decamethrin on stimulation-induced norepinephrine (NA) secretion in isolated rabbit heart. *IRCS Medical Science-Biochemistry*, 9, 587.

CHEN, Y.L. & CASIDA, J.E. (1974). Photodecomposition of pyrethrin, allethrin, phthalthrin and dimethrin. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 22, 212-214.

CHEN, S.Y., ZHANG, Z.W., HE, F.S., YAO, P.P., WU, Y.Q., SUN, J.X., LIU, L.H. & LI, Q.G. (1991). An epidemiological study on occupational acute pyrethroid poisoning in cotton farmers. *Occupational and Environmental Medicine*, 48, 77-81.

CHEN, W.Q., YUAN, L., XUE, R., LI, Y.F., SU, R.B., ZHANG, Y.Z. & LI, J. (2011). Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology*, 32, 355-361.

CHEN, N.N., LUO, D.J., YAO, X.Q., YU, C., WANG, Y., WANG, Q., WANG, J.Z. & LIU, G.P. (2012). Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30, 585-594.

CHINN, K. & NARAHASHI, T. (1986). Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of Physiology*, 380, 191-207.

CLARK, J.M. & MATSUMURA, F. (1982). Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca²⁺- and Ca²⁺ Mg ATPase in the squid, *Loligo pealei*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 4, 232-238.

CLARK, J.M. & MATSUMURA, F. (1987). The action of two classes of pyrethroids on the inhibition of brain Na/Ca and Ca/Mg ATP hydrolyzing activities of the American cockroach. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86, 135-145.

CLEMENTS, A.N. & MAY, T.E. (1977). The actions of pyrethroids upon the peripheral nervous system and associated organs in the locust. *Pesticide Science*, 8, 661-680.

COLADO, M. I., ORMAZABAL, M. J., ALFARO, M. J. & MARTIN, M. I. (1993). Effect of Bay K 8644 on the synthesis and metabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine in various brain areas of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45, 220-222.

COLE, L.M., RUZO, L.O., WOOD, E.J. & CASIDA, J.E. (1982). Pyrethroid metabolism: comparative fate in rats of tralomethrin, tralocythrin, deltamethrin and (1R, α S)-*cis*-cypermethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 631-636.

COLE, L.M. & CASIDA, J.E. (1983). Pyrethroid toxicology in the frog. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20, 217-224.

COLLET, J.H. & WELLER, P.J. (1994). Poloxamer. In: Handbook of Pharmaceutical Excipients, Wade, A. and Weller, P.J. (Eds), 2nd, American Pharmaceutical Association, Washington, and The Pharmaceutical Press, London. pp. 352-354. ISBN 9780917330568.

CRAWFORD, H.I., CROUCHER, A. & HUTSON, D.H. (1981). Metabolism of *cis*- and *trans*-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 130-135.

CROFTON, K.M. & REITER, L.W. (1984). Effects of two pyrethroid insecticides on motor activity and the acoustic startle response in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75, 318-328.

CROFTON, K.M. & REITER, L.W. (1988). The effects of type I and II pyrethroids on motor activity and the acoustic startle response in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10, 624-634.

DAI, Y., HUANG, X., CHENG, P., LIU, L., WANG, H., WANG, H. & KOU, J. (2015). Development of insecticide resistance in malaria vector *Anopheles sinensis* populations from Shandong province in China. *Malaria Journal*, 14, 62.

DAVIES, J.H. (1985). The pyrethroids: an historical introduction. In: The pyrethroid insecticides, Leahey, J.P. (Ed.), Taylor & Francis Ltd., London and Philadelphia, pp. 1-41. ISBN-13 978-0850662832

DAVIS, R.H. & SEARLE, R.J.G. (1977). Pyrethroid insecticides derived from some spiroalkane cyclopropanecarboxylic acids. In: Synthetic Pyrethroids, ACS Symposium Series No. 42, Elliot, M. (Ed), Washington, DC: American Chemical Society, pp. 37-44. ISBN-13 978-0841203686

DE WEILLE, J., SCHMID-ANTOMARCHI, H., FOSSET, M. & LAZDUNSKI, M. (1988). ATP-sensitive K⁺ channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 1312-1316.

DE WEILLE, J. R. & LEINDERS, T. (1989). The action of pyrethroids on sodium channels in myelinated nerve fibres and spinal ganglion cells of the frog. *Brain Research*, 482, 324-332.

DELESCLUSE, C., LEDIRAC, N., DE SOUSA, G., PRALAVORIO, M., LESCA, P. & RAHMANI, R. (1998). Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor. *Toxicology Letters*, 96, 33-39.

DERE, E., HUSTON, J.P. & SILVA, M.A.D.S. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31, 673-704.

DESAIAH, D., CUTKOMP, L.K., VEA, E.V. & KOCH, R.B. (1975). The effect of three pyrethroids on ATPase of insects and fish. *General Pharmacology*, 6, 31-34.

DESCOTES, J. (2000). Integrating Immunotoxicity with Effects on Other Biological Systems in Preclinical Safety Evaluation: A Perspective. *Toxicology*, 142, 157-160.

DOHERTY, J.D., SALEM, N. Jr., LAUTER, C.J. & TRAMS, E.G. (1981). Mn^{2+} and Ca^{2+} ATPases in lobster axon plasma membranes and their inhibition by pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69, 185-190.

DOHERTY, J.D., LAUTER, C.J. & SALEM, N. JR. (1986). Synaptic effects of the synthetic pyrethroid resmethrin in rat brain *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84, 373-379.

DOHERTY, J.D., NISHIMURA, K., KURIHARA, N. & FUJITA, T. (1987). Promotion of norepinephrine release and inhibition of calcium uptake by pyrethroids in rat brain synaptosomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29, 187-196.

DOLMETSCH, R.E., PAJVANI, U., FIFE, K., SPOTTS, J.M. & GREENBERG, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channelcalmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 294, 333-339.

EADSFORTH, C.V. & BALDWIN, U.K. (1983). Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin. *Xenobiotica*, 13, 67-72.

EBEN, A. & THYSSEN, J. (1981). Thiocyanate excretion in rats urine after intraperitoneal administration of FRC 1272 and decamethrin in comparable doses and after exposure to defined FRC 1272 concentrations in the inhalation air, Bayer report No. 10130.

ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY). (2016). Regulation (EU) No 528/2012: Concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Assessment Report: Cyfluthrin. Version March 2016. pp. 1-120

ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY). (2018). Regulation (EU) No 528/2012: Concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Assessment Report: Cyfluthrin. Version February 2018. pp. 1-120

ECKER, W. (1982). Biotransformation of (F-phenyl-UL-¹⁴C)-cyfluthrin; characterization and preliminary identification of metabolites, Report No. 1632.

EDWARDS, R., MILLBURN, P. & HUTSON, D.H. (1986). Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 84, 512-522.

EELLS, J.T. & DUBOCOVICH, M.L. (1988). Pyrethroid insecticides evoke neurotransmitter release from rabbit striatal slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246, 514-521.

EHRINGER, H. & HORNYKIEWICZ, O. (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) in Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klinische Wochenschrift*, 38, 1236-1239.

EL-DEMERDASH, F.M. (2007). Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. *Toxicology In Vitro*, 21, 392-397.

EL-DEMERDASH, F.M., YOUSEF, M.I. & AL-SALHEN, K.S. (2003). Protective effects of iso-flavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits. *Journal Environmental Science and Health Part B*, 38, 365-378.

EL-GOHARY, M., AWARA, W.M., NASSAR, S. & HAWA, S. (1999). Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*, 132, 1-8.

ELLIOT, M. (1971). The relationship between the structure and the activity of pyrethroids. *Bulletin of the World Health Organization*, 44, 313-324.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., PULMAN, D.A. & STEVENSON, J.H. (1973). A photoestable pyrethroid. *Nature*, 246, 169-170.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H. & PULMAN, D.A. (1974). Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, 248, 710-711.

ELLIOT, M. & JANES, N.F. (1978). Synthetic pyrethroids –a new class of insecticides. *Chemical Society Reviews*, 7, 473-505.

ELWAN, M.A., RICHARDSON, J.R., GUILLOT, T.S., CAUDLE, W.M. & MILLER, G.W. (2006). Pyrethroid pesticide-induced alterations in dopamine transporter function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211, 188–197.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). (1997). Veterinary medicines and information technology. Cyfluthrin. Summary report (1) of the Committee for Veterinary Medicinal Products, EMA/MRL/028/95-FINAL, November 1997. pp. 1-8.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). (2000). Veterinary medicines and information technology. Cyfluthrin, Summary Report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products. EMA/MRL/ 746/00-FINAL, July 2000. pp. 1–7.

ENAN, E. & MATSUMURA, F. (1992). Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1777-1784.

ERIKSSON, P. & FREDRIKSSON, A. (1991). Neurotoxic effects of two different pyrethroids bioallethrin and deltamethrin on immature and adult mice: changes variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108, 78-85.

ERIKSSON, P. & NORDBERG, A. (1990). Effects of two pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulations of muscarinic and nicotinic receptors in the neonatal mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102, 456-463.

EVANS, M.H. (1976). End-plate potentials in frog muscle exposed to a synthetic pyrethroid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 6, 547-550.

FAHN, S. (1986). Parkinson's disease and other basal ganglion disorders In: Diseases of the Nervous System: Clinical Neurobiology, Asbury, A.K., McKhann, G.M. and McDonald, W.I. (Eds.), 2nd Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1217-1228. ISBN-13 978-0721621470

FAO. (1980). Pesticide residues in food – 1979 evaluations. FAO Plant Production and Protection Paper 20 Suppl. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.

FAO (1986). Pesticide residues in food – 1985 evaluations. FAO Plant Production and Protection Paper 68 Suppl. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.

FAO. (1987). Pesticide residues in food – 1987 evaluations. FAO Plant Production and Protection Paper 84 Suppl. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.

FAO. (1999). Specifications and Evaluations for Plant Protection Products Beta-Cyfluthrin, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FARNHAM, A.W. (1977). Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I. Knock-down resistance. *Pest Management Science*, 8, 631-636.

FEO, M.L., ELJARRAT, E. & BARCELÓ, D. (2010). Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 692-705.

FLANNIGAN, S.A. & TUCKER, S.B. (1985). Variation in cutaneous sensation between synthetic pyrethroid insecticides. *Contact Dermatitis*, 13, 140-147.

FORSHAW, P.J. & BRADBURY, J.E. (1983). Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. *European Journal of Pharmacology*, 91, 207-213.

FORSHAW, P.J., LISTER, T. & RAY, D.E. (1987). The effects of two types of pyrethroid on rat skeletal muscle. *European Journal of Pharmacology*, 134, 89-96.

FUJITANI, J. (1909). Chemistry and pharmacology of insect powder. *Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 61, 47-75.

GABBIANELLI, R., FALCIONI, M.L., NASUTI, C., CANTALAMESSA, F., IMADA, I. & INOUE, M. (2009). Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chemico-Biological Interactions*, 182, 245-252.

GABRIELSSON, J. & WEINER, D. (2000). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis. Concepts and Applications, 3th Edition. Swedish Pharmaceutical Society. pp 924. ISBN 9186274929.

GAMMON, D., LIU, Z., CHANDRASEKARAN, A. & ELNAGGAR, S. (2015). The pharmacokinetic properties of bifenthrin in the rat following multiple routes of exposure. *Pest Management Science*, 71, 835-841.

GAMMON, D.W., BROWN, M.A. & CASIDA, J.E. (1981). Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15, 181-191.

GAUGHAN, L.C. ROBINSON, R.A. & CASIDA, J.E. (1978). Distribution and metabolic fate of *trans*- and *cis*-permethrin in laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 1374.

GAUGHAN, L.C., UNAI, T. & CASIDA, J.E. (1977). Permethrin metabolism in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 9-17.

GILLETTE, J.S. & BLOOMQUIST, J.R. (2003). Differential up-regulation of striatal dopamine transporter and alpha-synuclein by the pyrethroid insecticide permethrin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192, 287-293.

GIRAY, B., GURBAY, A. & HINCAL, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters*, 118, 139-146.

GLICKMAN, A.H. & CASIDA, J.E. (1982). Species and structural variations affecting pyrethroid neurotoxicity. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 4, 793-799.

GLICKMAN, A.H., HAMID, A.A.R., RICKERT, D.E. & LECH, J.J. (1981). Elimination and metabolism of permethrin isomers in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 57, 88-98.

GLORENNEC, P., SERRANO, T., FRAVALLO, M., WAREMBOURG, C., MONFORT, C., CORDIER, S., VIEL, J.F., LE GLÉAU, F., LE BOT, B. & CHEVRIER, C. (2017). Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in western France. *Environment International*, 104, 76-82.

GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]-norepinephrine, [3H]-dopamine and [3H]-dopa in various re- gions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, 13, 655-669.

GNADINGER, C.B. & CORL, C.S. (1929). Pyrethrum flowers, I: the quantitative determination of the active principles. *Journal of the American Chemical Society*, 51, 3054-3064.

GODIN, S.J., DEVITO, M.J., HUGHES, M.F., ROSS, D.G., SCOLLON, E.J., STARR, J.M., SETZER, R.W., CONOLLY, R.B. & TORNERO-VELEZ, R. (2010). Physiologically based pharmacokinetic modeling of deltamethrin: development of a rat and human diffusion-limited model. *Toxicological Sciences*, 115, 330-343.

GONZALEZ, F. J. & GELBOIN, H. V. (1994). Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metabolism Reviews*, 26, 165-183.

GRAY, A.J. & RICKARD, J. (1982). The toxicokinetics of deltamethrin in rats after intravenous administration of a toxic dose. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 205-215.

GRAY, A.J. & SODERLUND, D.M. (1985). Mammalian toxicology of pyrethroids. In: Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 4: Insecticides, Huston, D.H. and Roberts, T.R. (Eds.), John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 193-248. ISBN 13 978-0471904601.

GREEN, A.R. & HEAL, D.J. (1985). The effect of drugs on serotonin-mediated behavioral models. In: Neuropharmacology of Serotonin, Green, A.R. (Ed.), Oxford University Press, Oxford, pp. 326-365. ISBN-13: 978-0471917113.

GROMOV, L.A., SEREDI, P.I., SYROVATSKAIA, L.P., OVINOVA, G.V. & FILONENKO, M.A. (1993). Free radical mechanisms of memory disorders of toxic origin and experimental therapy of the condition. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*, 4, 24-26.

GROSSE, G., THIELE, T., HEUCKENDORF, E., SCHOPP, E., MERDER, S., PICKERT, G. & AHNERT-HILGER, G. (2002). Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture. *Neuroscience*, 112, 233-241.

GUENGERICH, F. P., KIM, D. H. & IWASAKI, M. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chemical Research In Toxicology*, 4, 168-179.

GUÍA DE PRODUCTOS ZOOSANITARIOS (Sexta edición, 1997). Bascuñan, L., Carbonell, R., Castro, C., Mejías, Y., Martínez, A. y Nogareda, J. (Eds.), Veterindustria (Madrid), Pulso Ediciones S.A., Barcelona, pp. 297-298.

GUPTA, R.C.H. (2012). Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles, 2nd Ed., Academic Press, London, pp. 1454. ISBN 978-0-12-385926-6.

GUPTA, S.P., PATEL, S., YADAV, S., SINGH, A.K., SINGH, S. & SINGH, M.P. (2010). Involvement of nitric oxide in maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: is there any link with lipid peroxidation. *Neurochemical Research*, 35, 1206-1213.

GUZMÁN-RAMOS, K., MORENO-CASTILLA, P., CASTRO-CRUZ, M., MCGAUGH, J.L., MARTÍNEZ-CORIA, H., LAFERLA, F.M. & BERMÚDEZ-RATTONI, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & Memory*, 19, 453-460.

HADNAGY, W., SEEMAYER, N.H., KUHN, K.H., LENG, G. & IDEL, H. (1999). Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicology Letters*, 107, 81-87.

HAMMAN, I. & FUCHS, R. (1981). Baythroid, a new insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 34, 121-151.

HANSEN, M., JØRS, E., LANDER, F., CONDARCO, G., DEBES, F., BUSTILLOS, N.T. & SCHLÜNSSEN, V. (2017). Neurological Deficits After Long-term Pyrethroid Exposure. *Environmental Health Insights*, 11, 1-11.

HARRISON, M.P. (1983). Cyhalothrin: The metabolism and disposition of 146814 in the rat: Part IV. Isolation and identification of the major urinary metabolites derived from [¹⁴C-benzyl] -or [¹⁴C-cyclopropyl] -146814 following oral administration. Unpublished study report No. YIBH 85-C9, Imperial Chemical Industries plc, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom. In WHO (2000), p. 44.

HE, F., SUN, J., HAN, K., WU, Y., YAO, P., WANG, S. & LIU, L. (1988). Effects of pyrethroid insecticides on subjects engaged in packaging pyrethroids. *British Journal of Industrial Medicine*, 45, 548-551.

HE, F., WANG, S. & LIU, L. (1989). Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Archives of Toxicology*, 63, 54-58.

HEAD, S.W. (1973). Chapter 3: Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: *Pyrethrum: The Natural Insecticide*, Casida, J.E. (Ed), Academic Press, Orlando. pp. 1-347. ISBN 9780323154901

HEDER, A.F., HIRSCH-ERNST, K.I., BAUER, D., KAHL, G.F. & DESEL, H. (2001). Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, 62, 71-79.

HERRERA, A. & LABORDA, E. (1988). Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, 3, 509-514.

HERVÉ, J.J. (1985). Agricultural, public health and animal health usage. In: *The pyrethroid insecticides*, Leahey, J.P. (Ed.), Taylor & Francis Ltd., London and Philadelphia, pp. 343-425.

HIJZEN, T.H. & SLANGEN, J.L. (1988). Effects of type I and type II pyrethroids on the startle response in rats. *Toxicology Letters*, 40, 141-152.

HIJZEN, T.H., DE BEUN, R. & SLANGEN, J.L. (1988). Effects of pyrethroids on the acoustic startle reflex in the rat. *Toxicology*, 49, 271-276.

HINSON, J. A., PUMFORD, N. R. & NELSON, S. D. (1994). The role of metabolic activation in drug toxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 26, 395-412.

HIROMORI, T., NAKANISHI, T., KAWAGUCHI, S., SAKO, H., SUZUKI, T. & MIYAMOTO, J. (1986). Therapeutic effects of methocarbamol on acute intoxication by pyrethroids in rats. *Journal of Pesticide Science*, 11, 9-14.

HOELLINGER, H., SONNIER, M., GREY, A.I., CONNERS, T.A., PICHON, J. & NGUYEN-HOANY-NAM (1985). *In vitro* covalent binding of cismethrin, bioresmethrin and their common alcohol to hepatic proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 77, 11-18.

- HOLCOMBE, G.W., PHIPPS, G.L. & TANNER, D.K. (1982). The acute toxicity of kelthane, dursban, disulfoton, pydrin and permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environmental Pollution*, 29, 167-178.
- HOLLOWAY, S.F., SALGADO, V.L., WU, C.H. & NARAHASHI, T. (1989). Kinetic properties of single sodium channels modified by fenvalerate in mouse neuroblastoma cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 414, 613-621.
- HOSSAIN, M.M., SUZUKI, T., SATO, I., TAKEWAKI, T., SUZUKI, K. & KOBAYASHI, H. (2004). The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *Neurotoxicology*, 25, 825-833.
- HOSSAIN, M.M. & RICHARDSON, J.R. (2011). Mechanism of pyrethroid pesticide-induced apoptosis: role of calpain and the ER stress pathway. *Toxicological Sciences*, 122, 512-525.
- HUNT, L.M. & GILBERT, B.N. (1977). Distribution and excretion rates of ¹⁴C-Labeled permethrin isomers administered orally to four lactating goats for 10 days. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 673-676.
- HUSAIN, R., ADHAMI, V.M. & SETH, P.K. (1996). Behavioral, neurochemical and neuropharmacological effects of deltamethrin in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 101-112.
- HUTSON, H.D. & LOGAN, C.I. (1986). The metabolic fate in rats of the pyrethroid insecticide WL 85871, a mixture of two isomers of cypermethrin. *Pest Management Science*, 17, 548-558.
- IOANNIDES, C. & PARKE, D.V. (1990). The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metabolism Reviews*, 22, 1-85.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1990). Environmental health criteria 97: Deltamethrin. Geneva: World Health Organization. p. 134.

JANA-KARA, B.R., JIHULLAH, W.A., SHAHI, B., DEV, V., CURTIS, C.F. & SHARMA, V.P. (1995). Deltamethrin impregnated bednets against *Anopheles minimus* transmitted malaria in Assam, India. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 73-83.

JONES, O.T. & LEE, G.A. (1986). Effects of pyrethroids on the activity of a purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 420-430.

JOY, R. (1994). Pyrethrins and pyrethroids insecticides. In: *Pesticides and Neurological Diseases*, Ecobichon, D.J and Joy, R.M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 291-312. ISBN 9781439805459

KANEKO, H., OHKAWA, H. & MIYAMOTO, J. (1981). Comparative metabolism of fenvalerate and the (2*S*, *S*)-isomer in rats and mice. *Pesticide Science*, 6, 317-326.

KANEKO, H., SHIBA, K., YOSHITAKE, A. & MIYAMOTO, J. (1987). Metabolism of fenpropathrin (S-3206) in rats. *Pesticide Science*, 12, 385-395.

KAR, S., SLOWIKOWSKI, S.P., WESTAWAY, D. & MOUNT, H.T. (2004). Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 29, 427-441.

KAREN, D.J., LI, W., HARP, P.R., GILLETTE, J.S. & BLOOMQUIST, J.R. (2001). Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos. *Neurotoxicology*, 22, 811-7.

KAVLOCK, R., CHERNOFF, N., BARON, R., LINDER, R., ROGERS, E., CARVER, B., DILLEY, J. & SIMMON, V. (1979). Toxicity studies with decamethrin synthetic pyrethroid insecticide. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 2, 751-765.

KHANNA, R.N., GUPTA, G.S. & ANAND, M. (2002). Kinetics of distribution of cypermethrin in blood, brain, and spinal cord after a single administration to rabbits. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69, 749-755.

KIRBY, M.L., CASTAGNOLI, K. & BLOOMQUIST, J.R. (1999). *In vivo* effects of deltamethrin on dopamine neurochemistry and the role of augmented neurotransmitter release. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65, 160-168.

KIRCHHOFF, L.V. (1998). Tripanosomiasis. En: Harrison: Principios de medicina interna, Vol. I, Fasci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L. y Longo, D.L. (Eds.), 14^a Ed., Mc Graw Hill, Interamericana de España S.A.U, Madrid, pp. 1367-1371. ISBN 13 9789682517334

KNOX, J.M., TUCKER, S.B. & FLANNIGAN, S.A. (1984). Paresthesia from cutaneous exposure to a synthetic pyrethroid insecticide. *Archives of Dermatology*, 120, 744-746.

KOCH, G., BELLI, L., GIUDICE, T., LORENZO, F., SANCESARIO, G.M., SORGE, R., BERNARDINI, S. & MARTORANA, A. (2013). Frailty among Alzheimer's disease patients. *CNS Neurological Disorders Drug Targets*, 12, 507-511.

KOLMODIN-HEDMAN, B., AKERBLOM, M., FLATO, S. & ALEX, G. (1995). Symptoms in forestry workers handling conifer plants treated with permethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 487-493.

KOVACIC, P. (2003). Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 2705-2709.

KROGIAS, C., EYDING, J. & POSTERT, T. (2010). Transcranial sonography in Huntington's disease. *International Review of Neurobiology*, 90, 237-257.

KROGIAS, C., STRASSBURGER, K., EYDING, J., GOLD, R., NORRA, C., JUCKEL, G., SAFT, C. & NINPHIUS, D. (2011). Depression in patients with Huntington disease correlates with alterations of the brain stem raphe depicted by transcranial sonography. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 36, 187-194.

KÜHN K., LENG G., BUCHOLSKI K., DUNEMANN L., & IDEL H. (1996). Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Chromatographia*, 43, 285-292.

LALONDE, D.I.V. & BROWN, A.W.A. (1954). The effect of insecticides on the action potentials of insect nerve. *Canadian Journal of Zoology*, 32, 74-81.

LARSON, L.L., KENAGA, E.E. & MORGAN, R.W. (1985). Commercial and experimental insecticides. Entomology Society of America, College Park, MD, Maryland. pp 105.

LAWRENCE, L.J. & CASIDA, J.E. (1982). Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 9-14.

LEQUESNE, L.P.M., MAXWELL, I.C. & BUTTERWORTH, S.T.G. (1980). Transient facial memory symptoms following exposure to synthetic pyrethroids: a clinical and electrophysiological assessment. *Neurotoxicology*, 2, 1-11.

LESSENGER, J.E. (1992). Five office workers inadvertently exposed to cypermethrin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 35, 261-267.

LHOSTE, J. (1964). Les pyrethrines. *Phytoma, Defense des Cultures*, 161, 21-25.

LIDE, D.R. & MILNE, G.W.A. (1994). *Handbook of Data on Organic Compounds: Volume I*, 3rd Edition, CRC Press Inc., Boca Ratón, p. 2405. ISBN 9780849304453

LINES, J.D. (1996). The technical issues. In: Net Gain: Operational Aspects of a New Health Intervention for Preventing Malaria Deaths, Lengeler, C., Cattani, J. and De Savigny, D. (Eds.), IDRC & WHO – TDR, Canada & Geneva, pp. 17-52.

LITCHFIELD, M.H. (1985). Toxicity to mammals. In: The pyrethroid insecticides, Leahey, J.P. (Ed.), Taylor & Francis Ltd., London and Philadelphia, pp. 99-150. ISBN-13: 978-0850662832.

LIU, G.P. & SHI, N. (2006). The inhibitory effects of deltamethrin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Toxicology Letters*, 161, 195-199.

LOCK, E.A. & BERRY, P.N. (1980). Biochemical changes in the rat cerebellum following cypermethrin administration. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 8, 623-626.

LOWENSTEIN, O. (1942). A method of physiological assay of pyrethrum extract. *Nature*, 150, 760-762.

LU, D., WANG, D., FENG, C., JIN, Y.E., ZHOU, Z., WU, C., LIN, Y. & WANG, G. (2013). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in textile workers, Eastern China. *Environment International*, 60, 137-144.

LUND, A. E. & NARAHASHI, T. (1982). Dose-dependent interaction of the pyrethroid isomers with sodium channels of squid axon membranes. *Neurotoxicology*, 3, 11-24.

LUO, Y. & ZHANG, M. (2011). Environmental Modeling and Exposure Assessment of Sediment-Associated Pyrethroids in an Agricultural Watershed. *PLoS One*, 6, e15794.

MADRAS, B.K., MILLER, G.M. & FISCHMAN, A.J. (2005). The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 57, 1397-1409.

MARONI, M. & FAIT, A. (1993). Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. International Centre for pesticide safety. *Toxicology*, 78, 175-180.

MARTÍNEZ, M.A., ARES, I., RODRÍGUEZ, J.L., MARTÍNEZ, M., ROURA-MARTÍNEZ, D., CASTELLANO, V., LOPEZ-TORRES, B., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & ANADÓN, A. (2018). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. *Science of the Total Environment*, 631-632, 1371-1382.

MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ, M., CASTELLANO, V.J. & DÍAZ, M.J. (2003). 5-HT loss in rat brain by type II pyrethroid insecticides. *Toxicology and Industrial Health*, 19, 147-155.

MAUND, S.J., HAMER, M.J., LANE, M.C.G., FARRELLY, E., RAPLEY, J.H., GOGGIN, U.M. & GENTLE, W.E. (2002). Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 9-15.

McLAUGHLIN, G.A. (1973). History of pyrethrum. In: Pyrethrum: The Natural Insecticide, Casida, J.E. (Ed), Academic Press, Orlando, pp. 3-15. ISBN 9780323154901.

MCRORY, J.E., SANTI, C.M., HAMMING, K.S., MEZEYOVA, J., SUTTON, K.G., BAILLIE, D.L., STEA, A. & SNUTCH, T.P. (2001). Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 3999-4011.

MEIJER, M., DINGEMANS, M. M., VAN DEN BERG, M. & WESTERINK, R. H. (2014). Inhibition of voltage-gated calcium channels as common mode of action for (mixtures of) distinct classes of insecticides. *Toxicological Sciences*, 141, 103-111.

MESTRES, R. & MESTRES, G. (1992). Deltamethrin: uses and environmental safety. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124, 1-18.

- MISSALE, C., NASH, S.R., ROBINSON, S.W., JABER, M. & CARON, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78, 189-225.
- MIYAMOTO, J. (1976). Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environmental Health Perspectives*, 14, 15-28.
- MIYAMOTO, J., KANEKO, H., TSUJI, R. & OKUNO, Y. (1995). Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. *Toxicology Letters*, 82, 933-940.
- MOORE, M.T., COOPER, C.M., SMITH JR, S., CULLUM, R.F., KNIGHT, S.S., LOCKE, M.A. & BENNETT, E.R. (2009). Mitigation of two pyrethroid insecticides in a Mississippi Delta constructed wetland. *Environmental Pollution*, 157, 250-256.
- MORISSEAU, C., DERBEL, M., LANE, T.R., STOUTAMIRE, D. & HAMMOCK, B.D. (1999). Differential induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by fenvaleric acid in male rats. *Toxicological Sciences*, 52, 148-153.
- MURAKOSHI, H. & TRIMMER, J.S. (1999). Identification of the Kv2.1 K channel as a major component of the delayed rectifier K current in rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19, 1728-1735.
- MUSICCO, M., SALAMONE, G., CALTAGIRONE, C., CRAVELLO, L., FADDA, L., LUPO, F., MOSTI, S., PERRI, R. & PALMER, K. (2010). Neuropsychological predictors of rapidly progressing patients with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 30, 219-228.
- NARAHASHI, T. (1962). The effect of the insecticide allethrin on membrane potentials of cockroach giant axons. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 61-66.
- NARAHASHI, T. (1985). Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. *Neurotoxicology*, 6, 3-22.

NARAHASHI, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & Toxicology*, 79, 1-14.

NARAHASHI, T., GINSBURG, K.S., NAGATA, K., SONG, J.H. & TATEBAYASHI, H. (1998). Ion channels as targets for insecticides. *Neurotoxicology*, 19, 581-590.

NASUTI, C., GABBIANELLI, R., FALCIONI, M., DI STEFANO, A., SOZIO, P. & CANTALAMESSA, F. (2007). Dopaminergic system modulation behavioral changes and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology*, 229, 194-205.

NASUTI, C., CARLONI, M., FEDELI, D., GABBIANELLI, R., DI STEFANO, A., SERAFINA, C.L., SILVA, I., DOMINGUES, V. & CICCOCIOPOPO, R. (2013). Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. *Toxicology*, 303, 162-168.

NICHOLSON, R.A., WILSON, R.G., POTTER, C. & BLACK, M.H. (1983). Pyrethroid- and DDT-evoked release of GABA from the nervous system *in vitro*. In: Mode of action, metabolism and toxicology. Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment. J. Miyamoto and P.C. Kearney (Eds) Pergamon Press, Oxford, pp. 75-78. ISBN 978-0-08-029224-3

NORVAL, R.A.I., SONENSHINE, D.E., ALLAN, S.A. & BURRIDGE, M.J. (1996). Efficacy of pheromone-acaricideimpregnated tail-tags decoys for controlling the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), on cattle in Zimbabwe. *Experimental & Applied Acarology*, 20, 31-46.

NRCC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL CANADA (1986). Pyrethroids: their effects on aquatic and terrestrial ecosystems. National Research Council of Canada, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Subcommittee on Pesticides and Industrial Organic Chemicals, Publication No. NRCC 24376 of the Environmental Secretariat, Ottawa.

NYARKO, A.K., KELLNER-WEIBEL, G.L. & HARVISON, P.J. (1997). Cytochrome P450-Mediated Metabolism and Nephrotoxicity of N-(3,5-Dichlorophenyl) succinimide in Fischer 344 Rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 37, 117-124.

O'MALLEY, M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *The Lancet*, 349, 1161-1166.

OKUNO, Y., SEKI, T., ITO, S., KANEKO, H., WATANABE, T., YOMODO, T. & MIYAMOTO, J. (1986). Differential metabolism of fenvalerate and granuloma formation II. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 83, 157-169.

OLGUN, S. & MISRA, H. P. (2006). Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 137-144.

OLSSON, A.O., BAKER, S.E., NGUYEN, J.V., ROMANOFF, L.C., UDUNKA, S.O., WALKER, R.D., FLEMMEN, K.L. & BARR, D.B. (2004). A liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and deet in human urine. *Analytical Chemistry*, 76, 2453-2461.

O'NEIL, M.J. (2001). The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th Edition. Whitehouse STation, N.J. Merck. pp. 481. ISBN 0911910131.

ONG, S.Q., AHMAD, H., JAAL, Z. & RUS, A.C. (2015). Comparative effectiveness of insecticides for use against the house fly (Diptera: *Muscidae*): determination of resistance levels on a Malaysian poultry farm. *Journal of Economic Entomology*, 109, 352-359.

OORTGIESEN, M., VAN KLEEF, R.G.M. & VIJVERBERG, H.P.M. (1989). Effects of pyrethroids on neurotransmitter-operated ion channels in cultured mouse neuroblastoma cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 34, 164-173.

PAP, L., BAJOMI, D. & SZEKELY, I. (1996). The pyrethroids, an overview. *International Pest Control*, 38, 15-19.

PATEL, S., SINGH, V., KUMAR, A., GUPTA, Y.K. & SINGH, M.P. (2006). Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: mechanism of neurodegeneration. *Brain Research*, 1081, 9-18.

PATI, P.C. & BHUNYA, S.P. (1989). Cytogenic effects of fenvalerate in mammalian *in vivo* test system. *Mutation Research*, 222, 149-154.

PAULUHN, J. (1996). Risk assessment of pyrethroids following indoor use. *Toxicology Letters*, 88, 339-348.

PEREZ, S.E., LAZAROV, O., KOPRICH, J.B., CHEN, E.Y., RODRIGUEZ-MENENDEZ, V., LIPTON, J.W., SISODIA, S.S. & MUFSON, E.J. (2005). Nigrostriatal dysfunction in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 25, 10220-10229.

PEREZ-REYES, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83, 117-161.

PLUIJMEN, M., DREVON, C., MONTESANO, R.M., MALAVEILLE, C., HAUTEFEUILLE, A. & BARTSCH, H. (1984). Lack of mutagenicity on synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium* strains and in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 137, 7-15.

POONAM, S., MYSRA, J. & RAMBIR, S. (2013). Deltamethrin Toxicity: A Review. *Indian Journal of Biological Studies & Research*, 2, 91-107.

PORTET, F., SCARMEAS, N., COSENTINO, S., HELZNER, E.P. & STERN, Y. (2009). Extrapyrmidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study. *Archives of Neurology*, 66, 1120-1126.

PRASAMTHI, K., MURALIDHARA. & RAJINI, P.S. (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 299-306.

PUIG, M., CARBONELL, E., XAMENA, N., CREUS, A. & MARCOS, R. (1989). Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by the pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. *Mutagenesis*, 4, 72-74.

RAGHAVENDRA, K., BARIK, T.K., REDDY, B.P., SHARMA, P. & DASH, A.P. (2011). Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research*, 108, 757-779.

RAO, G.V. & RAO, K.S. (1997). Modulation of K⁺ transport across synaptosomes of rat brain by synthetic pyrethroids. *Journal of the Neurological Sciences*, 147, 127-133.

RASKIN, L.A., SHAYWITZ, S.E., SHAYWITZ, B.A., ANDERSON, G.M. & COHEN, D.J. (1984). Neurochemical correlates of attention deficit disorder. *Pediatric Clinics of North America*, 31, 387-396.

RAY, D.E. & CREMER, J.E. (1979). The action of decamethrin (a synthetic pyrethroid) on the rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 10, 333-340.

RAY, D.E. (1980). An EEG investigation of decamethrin-induced choreoathetosis in the rat. *Experimental Brain Research*, 38, 221-227.

RAY, D.E. (1982). The contrasting actions of two pyrethroids (deltamethrin and cismethrin) in the rat. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 4, 801-804.

RAY, D.E., SUTHARSAN, S. & FORSHAW, P.J. (1997). Actions of pyrethroid insecticides on voltage-gated chloride channels in neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 18, 755-760.

RAY, D.E. & FRY, J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroids insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111, 174-193.

RAYMAN, R.B. (2006). Aircraft disinsection. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 77, 733-736.

REWCASTLE, N.B. (1991). Degenerative Diseases of the Central Nervous System. In: *Textbook of Neuropathology*. R.L. Davis and D.M. Robertson (Eds). 2nd Edition. Williams & Wilkins, London. pp. 904-961. ISBN 0 683 023446

RHODES, C., JONS, B.K., CROUCHER, A., HUTSON, D.H., LOGAN, C.I., HOPKINS, R., HOLL, B.E. & VICKERS, I.A. (1984). The bioaccumulation and biotransformation of *cis, trans*-cypermethrin in the rat. *Pesticide Science*, 25, 471-480.

RICE, A.D., GIBSON, R.W. & STRIBLEY, M.F. (1983). Effects of deltamethrin on walking, flight and potato virus Y-transmission by pyrethroid-resistant *Myzus persicae*. *The Annals of Applied Biology*, 102, 229-236.

RICHARDSON, J.R., TAYLOR, M.M., SHALAT, S.L., GUILLOT, T.S., CAUDLE, W.M., HOSSAIN, M.M., MATHEWS, T.A., JONES, S.R., CORY-SLECHTA, D.A. & MILLER, G.W. (2015). Developmental pesticide exposure reproduces features of attention-deficit hyperactivity disorder. *FASEB Journal*, 29, 1960-1972.

RICKARD, I. & BRODIE, M.E. (1985). Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroid deltamethrin with the onset of symptoms in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 23, 143-156.

RIEGELMAN, S. & COLLIER, P.S. (1980). The application of statistical moment theory to the evaluation of in vivo dissolution time and absorption time. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 8, 509-534.

RITTER, L. & CHAPPEL, M.J. (1997). Food Additives Series 39, Cyfluthrin. World Health Organization, Geneva, p. 1997. ISBN 9789241660396.

ROBERT, P.H., MULIN, E., MALLÉA, P. & DAVID, R. (2010). Review: Apathy diagnosis, assessment, and treatment in Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16, 263-271.

ROBERTSON, R.G., CLARKE, C.A., BOYCE, S., SAMBROOK, M.A. & CROSSMAN, A.R. (1990). The role of striatopallidal neurones utilizing gamma-aminobutyric acid in the pathophysiology of MPTP-induced parkinsonism in the primate: Evidence from [3H] flunitrazepam autoradiography. *Behavioural Research*, 531, 95-104.

ROMERO, A., ARES, I., RAMOS, E., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A. (2015). Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. In vitro assessment. *Environmental Research*, 138, 58-66.

ROMERO, A., RAMOS, E., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M. A., ARES, I., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & ANADÓN, A. (2012). Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology In Vitro*, 26, 823-830.

RUIGT, G. F., NEYT, H. C., VAN DER ZALM, J. M. & VAN DEN BERCKEN, J. (1987). Increase of sodium current after pyrethroid insecticides in mouse neuroblastoma cells. *Brain Research*, 437, 309-322.

RUZO, L.O. & CASIDA, J.E. (1977). Metabolism and toxicology of pyrethroids with dihalovinyl substituents. *Environmental Health Perspectives*, 21, 285-292.

RUZO, L.O., ENGEL, J.L. & CASIDA, J.E. (1979). Decamethrin metabolites from oxidative, hydrolytic, and conjugative reactions in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 725-731.

RUZO, L.O., UNAI, T. & CASIDA, J.E. (1978). Decamethrin metabolism in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 918-925.

SAHIB, I.K.A., PRASADA-RAO, K.S. & DESAIAH, D. (1987). Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca^{2+} ATPase and adenylate cyclase in rat brain. *Journal of Applied Toxicology*, 7, 75-80.

SAILLENFAIT, A.M., NDIAYE, D. & SABATÉ, J.P. (2015). Pyrethroids: Exposure and health effects - An update. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218, 281-292.

SALGADO, V.L. & NARAHASHI, T. (1993). Immobilization of sodium channel gating charge in crayfish giant axons by the insecticide fenvalerate. *Molecular Pharmacology*, 43, 626-634.

SANDOZ (1987). Fluvalinate and other pyrethroid insecticides: dermal effects in laboratory animals and human experience, Sandoz Agro Division, CH-4002 Basle, Switzerland, Report AGRO-DOK CBK 102'365/88.

SATPATHY, S.K., TYAGI, P.K., DAS, B.S., SRIVASTAVA, P. & YADAV, R.S. (1997). Evaluation of possible toxic effects of cyfluthrin during short-term, relevant community exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 681-687.

SCHALLEK, W. & WIERSMA, C.A.G. (1948). The influence of various drugs on a crustacean synaps. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 31, 35-47.

SCHECHTER, M.S., GREEN, N. & LAFORGE, F.B. (1949). Constituents of pyrethrum flowers. XXIII. Cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 3165-3173.

SCHNEIDER, R.P. (1975). Mechanism of inhibition of rat brain (Na^+/K^+)-adenosine triphosphatase by 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Biochemical Pharmacology*, 24, 939-946.

SCHWARTZ, G. (1978). Estimating the dimension model. *The Annals of Statistics*, 6, 461-464.

SCOTT, J.G. & MATSUMURA, F. (1983). Evidence of two types of toxic actions of pyrethroids on susceptible and DDT-resistant German cockroaches. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19, 141-150.

SEIXAS, G., GRIGORAKI, L., WEETMAN, D., VICENTE, J.L., SILVA, A.C., PINTO, J., VONTAS, J. & SOUSA, C.A. (2017). Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005799.

SHAFFER, T.J., MEYER, D.A. & CROFTON, K.M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*, 113, 123-136.

SHARMA, V.P. & YADAV, R.S. (1995). Cyfluthrin impregnated mosquito nets to control malaria in the mining settlement of Orissa, India. *Public Health*, 12, 9-17.

SHEETS, L.P., DOHERTY, J.D., LAW, M.W., REITER, L.W. & CROFTON, K.M. (1994). Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 126, 186-190.

SHELL (1983). Review of mammalian and human toxicology, Shell International Petroleum, Maatschappij B.V., Medical and Toxicology Division, The Hague, The Netherlands, Review Series MDT 83.004 and 83.001 (*cis*- and *trans*-cypermethrin and alpermethrin, respectively).

SHEPARD, H.H. (1939). The Chemistry and Toxicology of Insecticides, Burgess Publ, Minnesota-Minneapolis, pp. 270. NLM ID 13311080R.

SHERBY, S.M., ELDEFRAWI, A.T., DESHPANDE, S.S., ALBUQUERQUE, E.X. & ELDEFRAWI, M.E. (1986). Effects of pyrethroids on nicotinic acetylcholine receptor binding and function. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26, 107-115.

SHIRANI-BIDABADI, L., ZAHRAEI-RAMAZANI, A., YAGHOOBI-ERSHADI, M.R., RASSI, Y., AKHAVAN, A.A., OSHAGHI, M.A., ENAYATI, A.A., SAEIDI, Z., JAFARI, R. & VATANDOOST, H. (2017). Assessing the insecticide susceptibility status of field population of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esfahan Province, Central Iran. *Acta Tropica*, 176, 316-322.

SIMONIAN, N.A. & COYLE, J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 83-106.

SINGH, A.K., TIWARI, M.N., UPADHYAY, G., PATEL, D.K., SINGH, D., PRAKASH, O. & SINGH, M.P. (2012). Long-term exposure to cypermethrin induces the nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in adult rats: Postnatal exposure enhances the susceptibility during adulthood. *Neurobiology of Aging*, 33, 404-415.

SLOTKIN, T.A., LEVIN, E.D. & SEIDLER, F.J. (2009). Developmental neurotoxicity of parathion: progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicology and Teratology*, 31, 11-17.

SMITH, P.R. (1980). The effect of cismethrin on the rat dorsal root potentials. *European Journal of Pharmacology*, 66, 125-128.

SODERLUND, D.M. & CASIDA, J.E. (1977). Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse liver microsomal enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 7, 391-401.

SONG, J.H. & NARAHASHI, T. (1995). Selective block of tetramethrin-modified sodium channels by (\pm)- α -tocopherol (vitamin E). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275, 1402-1411.

SONG, J. H. & NARAHASHI, T. (1996). Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277, 445-453.

SPRINGFIELD, A.C., CARLSON, G.P. & DEFEO, J.J. (1973). Liver enlargement and modification of hepatic microsomal drug metabolism in rats by pyrethrum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 24, 298-308.

STAATZ, C.G., BLOOM, A.S. & LECH, J.J. (1982). A pharmacological study of pyrethroid neurotoxicity in mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 17, 287-292.

STAATZ-BENSON, C.G. & HOSKO, M.J. (1986). Interaction of pyrethroids and mammalian spinal neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 19-30.

STANLEY, E.M., WILSON, M.A. & FADEL, J.R. (2012). Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience Letters*, 511, 38-42.

STARR, J.M., GRAHAM, S.E., ROSS, D.G., TORNERO-VELEZ, R., SCOLLON, E.J., DEVITO, M.J., CROFTON, K.M., WOLANSKY, M.J. & HUGHES, M.F. (2014). Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: a study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology*, 320, 15-24.

STARR, J.M., SCOLLON, E.J., HUGHES, M.F., ROSS, D.G., GRAHAM, S.E., CROFTON, K.M., WOLANSKY, M.J., DEVITO, M.J. & TORNERO-VELEZ, R. (2012). Environmentally relevant mixtures in cumulative assessments: an acute study of toxicokinetics and effects on motor activity in rats exposed to a mixture of pyrethroids. *Toxicological Sciences*, 130, 309-318.

STAUDINGER, H. & RUZICKA, L. (1924). "Insektentotenstoffe", Parts 7-10. *Helvetica Chimica Acta*, 7, 390-458.

TAKEDA, K., & NARAHASHI, T. (1988). Chemical modification of sodium channel inactivation: separate sites for the action of grayanotoxin and tetramethrin. *Brain Research*, 448, 308-312.

TALTS, U., FREDRIKSSON, A. & ERIKSSON, P. (1998). Changes in behavior and muscarinic receptor density after neonatal and adult exposure to bioallethrin. *Neurobiology of Aging*, 19, 545-552.

TAPLIN, D. & MEINKING, T.L. (1990). Pyrethrins and pyrethroids in dermatology. *Archives of Dermatology*, 126, 213-221.

TIAN, Y.T., LIU, Z.W., YAO, Y., YANG, Z. & ZHANG, T. (2009). Effect of alpha-cypermethrin and theta-cypermethrin on delayed rectifier potassium currents in rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology*, 30, 269-273.

TILSON, H.A., HONG, J.S. & MACTUTUS, C.F. (1985). Effects of 5,5-diphenylhydantoin (Phenytoin) on neurobehavioral activity of organochlorine insecticides and permethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 233, 285-289.

TIWARI, M.N., SINGH, A.K., AHMAD, I., UPADHYAY, G., SINGH, D., PATEL, D.K., SINGH, C., PRAKASH, O. & SINGH, M.P. (2010). Effects of cypermethrin on monoamine transporters, xenobiotic metabolizing enzymes and lipid peroxidation in the rat nigrostriatal system. *Free Radical Research*, 44, 1416-1424.

TRILLO, L., DAS, D., HSIEH, W., MEDINA, B., MOGHADAM, S., LIN, B., DANG, V., SANCHEZ, M.M., DE MIGUEL, Z., ASHFORD, J.W. & SALEHI, A. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. translating basic science into clinical care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 1363-1379.

TRIPATHI, P., SINGH, A., AGRAWAL, S., PRAKASH, O. & SINGH, M.P. (2014). Cypermethrin alters the status of oxidative stress in the peripheral blood: relevance to Parkinsonism. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70, 915-924.

TUCKER, E.S. (1994). Chapter 1: Consequences of immunodeficiency. In: Immunotoxicology and immunopharmacology. J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson and I. Kimber (Eds). 2nd Edition. Raven Press, New York, pp. 1-18. ISBN 0-7817-0219-4.

TUCKER, S.B., FLANNIGAN, S.A. & ROSS, C.E. (1984). Inhibition of cutaneous paresthesia resulting from synthetic pyrethroid exposure. *International Journal of Dermatology*, 23, 686-689.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). (1987). Office of Pesticides and Toxic Substances. Office of Pesticide Programs. Pesticide fact Sheet: Cyfluthrin. No. 164, Washington D.C.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). (2000). For Your Information Synthetic Pyrethroids for Mosquito Control. Washington, DC: Prevention, Pesticides and Toxic substances (7506C).

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). (2001). Toxic chemical release reporting: Community right-to-know. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 372.65. Available: <http://www.epa.gov/epacfr40/chaptI.infor/chi-toc>.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). (2006). U.S. Environmental Protection Agency Permethrin Facts (Reregistration Eligibility Decision Fact Sheet). Available: https://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/permethrin_fs.htmExternal.

VAN DEN BERCKEN, J. & VIJVERBERG, H. P. M. (1980). Voltage clamp studies on the effects of allethrin and DDT on the sodium channels in frog myelinated nerve membrane. In: Insect Neurobiology and Pesticide Action. Soc. Chem. Ind London. pp. 79-85. ISBN 0901001619.

VAN DUIJN, E., KINGMA, E.M. & VAN DER MAST, R.C. (2007). Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 19, 441-448.

VERSCOYLE, R.D. & ALDRIDGE, W.N. (1980). Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 45, 325-329.

VIJVERBERG, H.P.M., RUIGT, G.S.F. & VAN DEN BERCKEN, J. (1982a). Structure-related effects of pyrethroid insecticides on the lateral-line sense organ and on peripheral nerves of the clawed frog *Xenopus laevis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 315-324.

VIJVERBERG, H. P., VAN DER ZALM, J. M. & VAN DEN BERCKEN, J. (1982b). Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature*, 295, 601-603.

VIJVERBERG, H. P., VAN DER ZALM, J. M., VAN KLEEF, R. G. & VAN DEN BERCKEN, J. (1983). Temperature-and structure-dependent interaction of pyrethroids with the sodium channels in frog node of Ranvier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 728, 73-82.

VIJVERBERG, H.P.M. & DE WEILLE, J.R. (1985). The interaction of pyrethroids with voltage-dependent Na channels, *Neurotoxicology*, 6, 23-34.

VIJVERBERG, H.P.M. & VAN DEN BERCKEN, J. (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical Reviews in Toxicology*, 21, 105-126.

VOLKOW, N.D., FOWLER, J.S., WANG, G.J., LOGAN, J., SCHLYER, D., MACGREGOR, R., HITZEMANN, R. & WOLF, A.P. (1994). Decreased dopamine transporters with age in health human subjects. *Annals of Neurology*, 36, 237-239.

WAGNER, J.G. (1975). Fundamentals of clinical pharmacokinetics, 1st Edition. Drug Intelligence Publications, Illinois, pp. 295. ISBN-13 978-0914768203.

WAGNER, J.G. (1976). Linear pharmacokinetic equations allowing direct calculation of many needed pharmacokinetic parameters from the coefficients and exponents of poly-exponential equations which have been fitted to the data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 4, 443-467.

WALKER, K. (2000). Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 354-354.

WALTON, J.N. (1977). In: Brain's diseases of the Nervous System. W.R. Brain, J.N. Walton. (Eds) 8th Edition. Oxford University Press, Oxford. Pp 1-1277. ISBN 9780192613097.

WANG, X., MARTÍNEZ, M. A., DAI, M., CHEN, D., ARES, I., ROMERO, A., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M., RODRÍGUEZ, J.L., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. & ANADÓN, A. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environmental Research*, 149, 86-104.

WAX, P.M., HOFFMAN, R.S. & GOLDFRANK, L.R. (1994). Fatality associated with inhalation of a pyrethrin shampoo. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 32, 457-460.

WEIDINGER, A. & KOZLOV, A. V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5, 472-484.

WELSH, J.H. & GORDON, H.T. (1947). The mode of action of certain insecticides on the arthropod nerve axon. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 30, 147-171.

WHO (1996). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1996-1997. World Health Organization.

WHO (1998) Interim specifications for pesticides used in public health. World Health Organization, Division of control of tropical diseases, WHO pesticide evaluation scheme (WHOPES).

WHO. (2005). Safety of pyrethroids for public health use. WHO Pesticide Evaluation Scheme World Health Organization - Chemical Safety Team. Geneva: World Health Organization.

WIESELER, B., KÜHN, K-H., LENG, G. & IDEL, H. (1998). Effects of pyrethroid insecticides on pest control operators. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 837-844.

WOOTEN, G.F. (1990). Chapter 23: Parkinsonism In: Neurobiology of disease. En: A.L. Pearlman and R.C. Collins. (Eds.) 4th Edition. Oxford University Press, Oxford, pp. 454-468. ISBN 0195053192.

WOUTERS, W., VAN DEN BERCKEN, J. & VAN GINWEKEN, A. (1977). Presynaptic action of the pyrethroid insecticide allethrin in the frog motor end plate. *European Journal of Pharmacology*, 43, 163-171.

WU, A. & LIU, Y. (2000). Deltamethrin induces delayed apoptosis and altered expression of p53 and bax in rat brain. *Environmental toxicology and pharmacology*, 8(3), 183-189.

WU, Z., CHEN, S. & PAN, H. (2005). Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 18142-18151.

XIONG, J., ZHANG, X., HUANG, J., CHEN, C., CHEN, Z., LIU, L., ZHANG, G, YANG, J., ZHANG, Z., ZHANG, Z., LIN, Z., XIONG, N. & WANG, T. (2016). Fenpropathrin, a widely used pesticide, causes dopaminergic degeneration. *Molecular Neurobiology*. 53, 995-1008.

YAMAMOTO, D., YEH, J.Z., & NARAHASHI, T. (1986). Ion permeation and selectivity of squid axon sodium channels modified by tetramethrin. *Brain Research*, 372, 193-197.

YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T. & UNO, T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 6, 165-175.

YAMASAKI, T. & ISHI, T. (1952). Studies on the mechanism of action of insecticides. IV. The effects of insecticides on the nerve conduction of insect, Oyo-Kontyu. *Journal Oyo-Kontyu (Nippon Society of Applied Entomology)*, 7, 157-164.

YAN, D., ZHANG, Y., LIU, L. & YAN, H. (2016). Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 32222.

YANG, D., WANG, X., CHEN, Y. T., DENG, R. & YAN, B. (2009). Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 49-58.

YU, C.D. (1994). Polyoxyethylene castor oil derivatives. In: Handbook of Pharmaceutical Excipients, Wade, A. and Weller, P.J. (Eds), 2nd, American Pharmaceutical Association, Washington, and The Pharmaceutical Press, London. pp. 371-374. ISBN 9780917330568.

ZHANG, Z.W., SUN, J.X., CHEN, S.Y., WU, Y.Q. & HE, F.S. (1991). Levels of exposure and biological monitoring of pyrethroids in spraymen. *British Journal of Industrial Medicine*, 48, 82-86.

ZHANG, J.J., YI, W., XIANG, H.Y., LI, M.X., LI, W.H., WANG, X.Z. & ZHANG, J.H. (2011). Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*, 10, 786-796.

ZLOTKIN, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual Review of Entomology*, 44, 429-455.

ANEXO

9. ANEXO

Los resultados de la presente investigación han dado lugar a dos publicaciones:

J.L. RODRÍGUEZ, I. ARES, V. CASTELLANO, M. MARTÍNEZ, M.R. MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, A. ANADÓN and M.A. MARTÍNEZ (2016). Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Environmental Research*, 146, 388-394. (ISSN: 0013-9351) Impact Factor: 3.088 Rank in Category: Environmental Sciences, 15/216, D1

J.L. RODRIGUEZ, I. ARES, M. MARTINEZ, M.R. MARTINEZ-LARRAÑAGA, A. ANADÓN, and M.A. MARTINEZ (2018). Bioavailability and nervous tissue distribution of pyrethroid insecticide cyfluthrin in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 220-226. (ISSN: 0278-6915) Impact Factor: 3.778, Rank in Category: Food Science and Technology, 8/129, D1



Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats

J.L. Rodríguez, I. Ares, V. Castellano, M. Martínez, M.R. Martínez-Larrañaga, A. Anadón*, M.A. Martínez

Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2015

Received in revised form

15 January 2016

Accepted 18 January 2016

Available online 29 January 2016

Keywords:

Cyfluthrin

Pyrethroid

Neurotoxicology

Male rats

Monoaminergic neurotransmitters

ABSTRACT

The effects of cyfluthrin oral exposure (1, 5, 10 and 20 mg/kg bw, 6 days) on brain region monoamine levels of male rats were examined. Cyfluthrin-treated rats (1, 5 and 10 mg/kg bw, orally 6 days), had no visible injury, i.e., no clinical signs of dysfunction were observed. However, rats treated with cyfluthrin at the highest dose (20 mg/kg bw, orally 6 days) showed skeletal muscle contraction in the hind limbs, slight movement incoordination without any signs of dyskinesia and tremor after 1–2 h of treatment. These signs were reversible at 6 h after dose. After last dose of cyfluthrin, dopamine (DA) and serotonin (5-HT) and its metabolites levels were determined in brain regions hypothalamus, midbrain, hippocampus, striatum and prefrontal cortex by HPLC. Cyfluthrin (1 mg/kg bw, orally 6 days) did not affect the DA, 5-HT and metabolites levels in the brain regions studied. Cyfluthrin (5, 10 and 20 mg/kg bw, orally 6 days) caused a statistically significant decrease in DA and its metabolites DOPAC and HVA levels and in 5-HT and its metabolite 5-HIAA levels in a brain region- and dose-related manner. Moreover, cyfluthrin (20 mg/kg bw, orally 6 days) evoked a statistically significant increase in 5-HT turnover in striatum and midbrain, and in DA turnover in striatum and prefrontal cortex. These findings indicate that serotonergic and dopaminergic neurotransmission is affected by exposure to cyfluthrin and may contribute to the overall spectrum of neurotoxicity caused by this pyrethroid.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

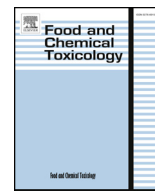
Pyrethroid insecticides are synthetic analogs of the natural pyrethrins. Pyrethrins are components of extracts from the flowers of *Chrysanthemum* spp. Pyrethroids are more stable in light and air than natural pyrethrins. Today, they are one of the most widely used domestic and agricultural pesticides (Heudorf and Angerer, 2001; Lothrop et al., 2007), they are used to control pests in residential and agricultural settings, to treat head lice and scabies in humans and fleas in pets, for public health vector control, and for disinfection of commercial aircrafts (Anadón et al., 2009, 2013a; Wei et al., 2012; USEPA, 2013). Pyrethroid insecticides account for more than 30% of insecticides used worldwide (Barr et al., 2010). Because of they are generally more toxic to insects than nontarget species (Soderlund et al., 2002), the use of pyrethroids has increased dramatically over the past decade and will likely increase further as they are replacing other pesticides (e.g.,

organophosphate pesticides) that are considered to have higher mammalian toxicity (Williams et al., 2008).

Substantial information about the toxicity of pyrethroid insecticides exists; their primary mode of action is on the voltage-sensitive channels in neurons. Pyrethroids induce neurotoxicity mainly by slowing the opening and closing of voltage-gated sodium channels (Na^+) altering the release of neurotransmitters, however, the effect of pyrethroids on neurotransmitter release may be dual stimulatory or inhibitory or both (Hossain et al., 2004). Moreover, they are generally good “knockdown” agents due to their ability to induce repetitive firing in axons, resulting in restlessness, un-coordination and hyperactivity followed by prostration and paralysis. Currently, it knows that the pyrethroids act on the expressions of the *kdr* gen (S4,S5 and S6- domain II of Na^+), and mutating this gene produces the resistance of insects to pyrethroids (Ranson et al., 2000; Tan et al., 2012). According to the clinical symptoms in animals receiving acute toxic doses, the pyrethroids form two groups. Type I pyrethroids such as permethrin cause hyper-excitation, ataxia, tremors and paralysis. Type II pyrethroids, such as cyfluthrin, have an α -cyanophenoxybenzyl substituent, and cause hypersensitivity, salivation, and choreoathetosis (Ray and Fry, 2006). Although voltage-gated calcium channels and interaction with the GABA receptor-ionophore

* Corresponding author.

E-mail addresses: jrodriguez3@unmsm.edu.pe (J.L. Rodríguez), irmaal@vet.ucm.es (I. Ares), victorc@vet.ucm.es (V. Castellano), mmartine@vet.ucm.es (M. Martínez), mrm1@vet.ucm.es (M.R. Martínez-Larrañaga), anadon@vet.ucm.es (A. Anadón), arantxam@vet.ucm.es (M.A. Martínez).



Bioavailability and nervous tissue distribution of pyrethroid insecticide cyfluthrin in rats

José-Luis Rodríguez, Irma Ares, Marta Martínez, María-Rosa Martínez-Larrañaga, Arturo Anadón, María-Aránzazu Martínez*

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Pyrethroids
Cyfluthrin
Toxicokinetics
Blood and central nervous system

ABSTRACT

Toxicokinetics of cyfluthrin after single oral [20 mg/kg body weight (bw)] and intravenous (IV) (3 mg/kg bw) doses were studied in rats. Serial blood samples were obtained after oral and IV administration. Brain tissue samples were also collected after oral administration. Cyfluthrin concentrations in plasma and brain tissues (hypothalamus, striatum, hippocampus and frontal cortex) were quantified using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS). Cyfluthrin disposition was best described by the use of a two-compartment open model. When given orally, plasma kinetics showed an extensive oral absorption of cyfluthrin and a slow elimination. The area under the concentration-time curve [AUC_(0–24h)] and maximal plasma concentration (*C*_{max}) were 6.11 ± 1.06 mg h/L and 0.385 ± 0.051 µg/mL, respectively; β phase elimination half-life (*T*_{1/2β}) was 17.15 ± 1.67 h. Oral bioavailability was found to be $71.60 \pm 12.36\%$. After oral administration, cyfluthrin was widely distributed to brain tissues. AUC_(0–24h) was significant higher in all tested brain tissues than in plasma. The largest discrepancy was found for hypothalamus. AUC_(0–24h), *C*_{max} and *T*_{1/2β} in hypothalamus were 19.36 ± 2.56 mg h/L, 1.21 ± 0.11 µg/g and 22.73 ± 1.60 h, respectively. Assuming the identified toxicokinetics parameters, this study serves to better understand mammalian toxicity of pyrethroid cyfluthrin and to design further studies to characterize its neurotoxicity.

1. Introduction

Pyrethroid insecticides are synthetic analogues of the natural pyrethrins, which are components of extracts from the flowers of *Chrysanthemum* spp. Pyrethrins are potent insecticides with relatively low mammalian toxicity but are very sensitive to air and light. Hence, the use of pyrethrins for crop protection and to control disease-carrying insects is limited. With an altered structure, the pyrethroids are more photostable, and generally more toxic to insects than natural pyrethrins. Pyrethroids have replaced other pesticides (e.g. organophosphates) that are considered to have higher mammalian toxicity (Williams et al., 2008). From the many uses of pyrethroids including agricultural, commercial and residential pest control, and veterinary and medical practices (Anadón et al., 2009, 2013a; Wei et al., 2012), humans can be exposed to multiple pyrethroids (Amweg et al., 2005; Bradberry et al., 2005; Stout et al., 2009). Exposure to pyrethroids in the general population may occur by dietary intake of pesticide residues on fruits, vegetables, cereals but also by dermal contact and respiratory uptake (Schettgen et al., 2002; Ferland et al., 2015). Although clinical features resulting from acute accidental exposure to pyrethroids are

well described in humans (e.g. paraesthesia, and respiratory, eye and skin irritation), several recent epidemiological studies have raised concerns about potentially adverse effects on sperm quality and sperm DNA, reproductive hormones, and pregnancy outcomes (Saillenfait et al., 2015).

The basic mechanism of pyrethroid action in both insects and mammals involves interference with the nerve membrane sodium channels, leading to prolonged depolarization and induction of repetitive activity (Vijverberg and van den Bercken, 1982; Narahashi, 1985). Pyrethroids are commonly divided into Type I compounds (or T-syndrome pyrethroids), which lack an α -cyano substituent and Type II compounds (or CS-syndrome pyrethroids), which contain an α -cyano-phenoxybenzyl substituent (Gammon et al., 1981; Verschoyle and Aldridge, 1980; Soderlund et al., 2002; Wolansky et al., 2005). The main symptom of exposure to the former is tremor, whereas choreoathetosis and salivation are the main symptoms of the latter. Some pyrethroids produced tremors and salivation, classified as the intermediate TS-syndrome. The nervous system is the primary target tissue for the neurotoxicity produced soon after acute exposure to pyrethroids in laboratory animals (Scollon et al., 2011).

* Corresponding author.

E-mail address: arantxam@vet.ucm.es (M.-A. Martínez).